

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
8 mars 2001 (08.03.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/16171 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷:
C07K 14/15, C12N 15/48, A61P 35/00,
15/00, A61K 39/21, 48/00, C12N 5/10

(30) Données relatives à la priorité:
99/11141 1 septembre 1999 (01.09.1999) FR
99/11793 15 septembre 1999 (15.09.1999) FR

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/02429

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US): **BIO MERIEUX** [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy l'Etoile (FR). **INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE** [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR).

(22) Date de dépôt international:
1 septembre 2000 (01.09.2000)

(72) Inventeurs; et

(25) Langue de dépôt: français

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): **MALLET, François** [FR/FR]; 84, rue Anatole France, F-69100 Villeurbanne (FR). **COSSET, François-Loïc** [FR/FR]; 30, Grande rue de la Guillotière, F-69007 Lyon (FR). **BLOND,**

(26) Langue de publication: français

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD FOR DETECTING THE EXPRESSION OF AN ENVELOPE PROTEIN OF A HUMAN ENDOGENOUS RETROVIRUS AND USES OF A GENE CODING FOR SAID PROTEIN

(54) Titre: PROCEDE DE DETECTION DE L'EXPRESSION D'UNE PROTEINE D'ENVELOPPE D'UN RETROVIRUS ENDOGENE HUMAIN ET UTILISATIONS D'UN GENE CODANT POUR CETTE PROTEINE

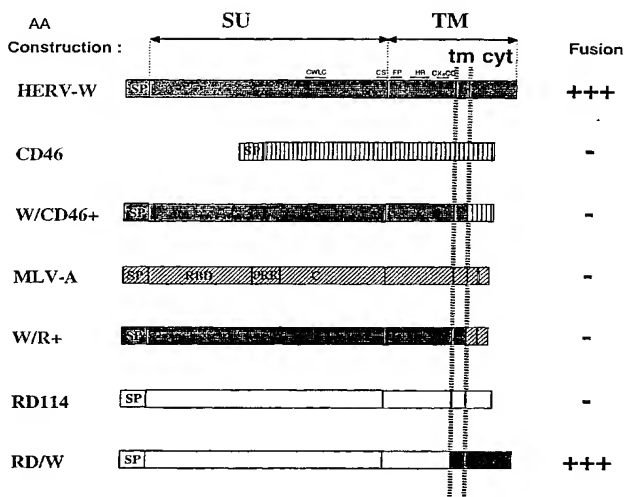


Figure XXX. Schéma et caractérisation des Env HERV-W chimères.
DIAGRAM AND CHARACTERISATION OF CHIMERIC Env HERV-W

SP...SIGNAL SEQUENCE
RBD...RECEPTOR BINDING DOMAIN
PRR...PROTEINE-RICH REGION
C...CARBOXY-TERMINAL
TM...TRANSMEMBRANE SUBMIT
SU...SURFACE SUBMIT
tm...TRANSMEMBRANE ANCHORING DOMAIN
cyt...CYTOPLASMIC PART
AA...CONSTRUCT

(57) Abstract: The invention concerns a method for detecting the expression of an envelope protein or polypeptide of a human endogenous retrovirus, characterised in that the protein or polypeptide has a polypeptide sequence comprising the sequence SEQ ID NO: 1 or a fragment of SEQ ID NO: 1 or a sequence having, for every sequence of 20 amino acids, at least 90 % identity with the SEQ ID NO: 1 or with a fragment of SEQ ID NO: 1, and the method consists in detecting the fusogenic power of said protein or said fragment in the cells of a cell tissue or cell culture, by demonstrating the formation of syncytia. A gene or a nucleic acid or a fragment thereof is used for preparing a therapeutic or prophylactic composition, in particular for treating cancers and for preventing deficiency in placental development.

(57) Abrégé: Le procédé de détection de l'expression d'une protéine ou d'un polypeptide d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain, est caractérisé en ce que la protéine ou le polypeptide présente une séquence polypeptidique qui comprend la séquence SEQ ID NO: 1 ou un fragment de SEQ ID NO: 1 ou une séquence présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 90% d'identité avec la séquence SEQ ID NO: 1 ou avec un fragment de SEQ ID NO: 1, et en ce qu'on détecte le pouvoir

[Suite sur la page suivante]



Jean-Luc [FR/FR]; 75, bis rue des Aqueducs, F-69005 Lyon (FR). LAVILLETTE, Dimitri [FR/FR]; 8, rue de Bourtibourg, F-10290 Bercenay Le Hayer (FR). BOU-
TON, Olivier [FR/FR]; 48, avenue du Chater, F-69340
Francheville (FR). RUGGIERI, Alessia [FR/FR]; 27, rue
du Puits, F-68100 Mulhouse (FR).

(74) Mandataire: CABINET GERMAIN & MAUREAU;
Boîte postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).

(81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (*régional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

- Avec rapport de recherche internationale.
- Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
reçues.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

fusogène de ladite protéine ou dudit fragment dans des cellules d'un tissu cellulaire ou d'une culture cellulaire, par la mise en évi-
dence de la formation de syncytia. On utilise un gène ou un acide nucléique ou un fragment de ceux-ci pour préparer une composition
thérapeutique ou prophylactique, notamment pour traiter des cancers et prévenir une déficience dans l'élaboration du placenta.

PROCEDE DE DETECTION DE L'EXPRESSION D'UNE PROTEINE
D'ENVELOPPE D'UN RETROVIRUS ENDOGENE HUMAIN ET UTILISATIONS
D'UN GENE CODANT POUR CETTE PROTEINE

5 Les rétrovirus sont des virus enveloppés qui portent des spicules glycoprotéiques codées par les virus à leur surface. Ces glycoprotéines d'enveloppe sont synthétisées sous la forme de précurseurs polyprotéiques (Pré-env) qui sont ensuite clivés par des protéases cellulaires en protéine de surface mature (SU) et en protéine transmembranaire (TM). Les glycoprotéines d'enveloppe sont impliquées dans
10 l'entrée des virus dans les cellules hôte. Elles reconnaissent spécifiquement et se lient à des récepteurs de surface cellulaire et sont nécessaires pour la fusion de l'enveloppe virale et des membranes cellulaires de l'hôte. Le récepteur et l'enveloppe sont des molécules multamériques ou oligomériques. Pour tous les virus enveloppés, les interactions des glycoprotéines d'enveloppe avec le ou les récepteur(s) cellulaire(s)
15 conduisent à des réarrangements conformationnels de l'enveloppe nécessaires à l'exposition du peptide de fusion. La fusion a lieu à la surface de la cellule ou dans des vésicules cellulaires suivant la voie d'endocytose du virion. De plus, pour permettre l'entrée du virus, une fusion médiée par les protéines de surface virales peut, dans certaines conditions, provoquer une fusion cellule à cellule avec pour résultat la
20 formation de cellules multinucléées géantes ou syncytia. La formation de syncytia est réalisée par au moins deux voies : un virion peut simultanément fusionner avec deux cellules, on parle alors de fusion " from without ", ou une cellule infectée qui exprime les glycoprotéines d'enveloppe à sa surface peut fusionner avec une cellule adjacente (fusion " from within ").

25 Les déterminants de l'enveloppe et la séquence des événements causant les changements conformationnels de l'enveloppe lors des processus de fusion " from without " sont bien documentés pour les orthomyxovirus qui nécessitent un environnement acide des vésicules d'endocytose pour leur entrée (Skehel, J. J. et al., PNAS, 79 :968-972 (1982)). Pour les rétrovirus, pour lesquels la voie d'entrée est
30 indépendante du pH, les déterminants précis et les étapes, menant de la reconnaissance du récepteur à l'activation de la fusion ne sont pas encore élucidés. D'autres rétrovirus sont connus pour induire une fusion cellule à cellule (" fusion from within "), tels que

le virus de la leucémie féline, le virus de la tumeur mammaire de la souris, le virus de la réticuloendothéliose aviaire, VIH et SIV.

Par ailleurs, Fefferey S. Jones et Rex Risser (Journal of Virology, Janv. 1993, p 67-74) ont montré que les glycoprotéines d'enveloppe du virus de la leucémie murine écotrope (MuLV) de type sauvage, sous la dépendance du LTR viral, étaient
5 capables d'induire la formation de syncytia dans des cellules de rat XC en l'absence de virion (fusion " from within ").

De la connaissance des inventeurs, il n'a jamais été montré de pouvoir fusogène, dans un processus de fusion " from within ", des glycoprotéines d'enveloppe
10 d'un rétrovirus endogène humain.

Des auteurs ont bien émis l'hypothèse que l'enveloppe rétrovirale endogène de ERV3, un rétrovirus endogène humain proche de MLV (Moloney Leukemia Virus), pouvait être impliquée *in vivo* dans l'élaboration du placenta via un processus de fusion (Patrick J. W. Venables et al., Virology, 211, 589-592 (1995)) mais
15 ce phénomène n'a jamais été démontré *in vitro*. D'autre part, les études sur le polymorphisme de *env* ERV3, sur des individus d'origine caucasienne, ont permis de mettre en évidence la présence d'une mutation dans la région (SU) de l'enveloppe ERV3 générant un codon stop précoce présent à l'état homozygote dans 1% de la population étudiée, sans que ces individus présentent d'anomalie de la grossesse ou du
20 développement placentaire (Nathalie de Parseval et Thierry Heidmann, Journal of Virology, Vol ; 72, N° 4, pages 3442-3445 (1998)), mettant ainsi en cause l'hypothèse précédemment émise.

Les présents inventeurs ont maintenant mis en évidence *in vitro* que la glycoprotéine d'enveloppe de HERV-W non modifiée, exprimée sous la dépendance
25 d'un promoteur, de préférence un promoteur hétérologue, possède des propriétés fusogènes.

HERV-W est une famille de rétrovirus endogènes humains multi-copie récemment décrite, dénommée ainsi en raison de l'homologie entre le site de fixation de l'amorce de la transcription inverse et celui des rétrovirus aviaires utilisant l'ARNt
30 Trp. Aucune entité compétente pour sa réplication n'a été mise en évidence. La fonctionnalité d'une région promotrice a été vérifiée et, parmi différents tissus humains sains testés, son expression semble être restreinte au placenta par Northern Blot (J. L

Blond et al., Journal of Virology, Vol. 73, N° 2, pages 1175-1185 (1999)). Un cadre ouvert de lecture unique codant pour une enveloppe rétrovirale potentiellement fonctionnelle existe sur le chromosome 7. Un clone ADNc correspondant vraisemblablement à un transcrit sous génomique et portant la séquence de l'enveloppe
5 complète a été isolé à partir de matériel placentaire (clone cl.PH74, GenBank AF072506, dont la séquence est identifiée par SEQ ID NO :2). Les études phylogénétiques effectuées au niveau protéique indiquent que la protéine d'enveloppe est de type D. La séquence SEQ ID NO :2 donnée en fin de description correspond donc à la séquence nucléotidique en ADNc complète du clone cl.PH74 dont la
10 séquence protéique est identifiée par SEQ ID NO :1.

Env HERV-W possède tous les "attributs" d'une enveloppe rétrovirale : en particulier, un peptide leader, les deux sous unités caractéristiques SU et TM séparées par un site de clivage par les furines et, au niveau de sa TM, elle possède un peptide de fusion hydrophobe, une région immunosuppressive et une région carboxyl
15 transmembranaire suivie d'une queue cytoplasmique longue. L'expression de Env HERV-W a été mise en évidence dans le placenta.

Les expériences réalisées par les inventeurs montrent que Env HERV-W entraîne, par fusion de cellule à cellule, la formation de syncytia dans différentes lignées cellulaires testées d'origine humaine et simienne. Le phénomène de fusion
20 observé est dépendant de la reconnaissance de récepteur(s) spécifique(s), comme montré de manière directe lors de transfections et de manière indirecte lors de co-cultures des cellules transfectées avec d'autres types cellulaires. Les présents inventeurs ont par ailleurs identifié le récepteur spécifique de Env HERV-W par une approche de compétition s'appuyant sur la propriété d'interférence des enveloppes
25 rétrovirales, en bloquant des récepteurs cellulaires par une protéine d'enveloppe autre que Env HERV-W, empêchant ainsi la formation de syncytia. Le récepteur identifié par les présents inventeurs est le récepteur hATB^o des rétrovirus mammifères de type D exprimé dans les cellules humaines (Rasko E. J. et al. PNAS, 1999, 96 : 2129-2134 et Tailor C. S. et al. J. Virol., 1999, 73(5) : 4470-4474). L'utilisation de ce récepteur, dont
30 le procédé de mise en évidence est décrit dans un des exemples, fait également partie de la présente invention.

Aussi la présente invention a pour objet un procédé de détection de l'expression d'une protéine ou d'un polypeptide d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain, selon lequel la protéine ou le polypeptide présente une séquence polypeptidique qui comprend la séquence SEQ ID NO :1 ou un fragment de SEQ ID NO :1, ou une séquence présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80 %, de préférence au moins 90% ou encore au moins 95% d'identité avec la séquence SEQ ID NO:1 ou avec un fragment de SEQ ID NO :1, et selon lequel on détecte le pouvoir fusogène de ladite protéine ou dudit fragment dans des cellules d'un tissu cellulaire ou d'une culture cellulaire, par la mise en évidence de la formation de syncytia.

Un autre objet de l'invention est un procédé de détection de l'expression d'une protéine ou d'un polypeptide d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain, selon lequel la protéine ou le polypeptide présente une séquence polypeptidique présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80 %, de préférence au moins 90% ou encore au moins 95% d'identité avec la séquence SEQ ID NO:1, et selon lequel on détecte le pouvoir fusogène de ladite protéine dans des cellules d'un tissu cellulaire, ou d'une culture cellulaire par la mise en évidence de la formation de syncytia.

Selon l'invention, ladite protéine ou ledit polypeptide présente une séquence polypeptidique qui comprend la séquence SEQ ID NO :1 ou un fragment de SEQ ID NO :1, ou une séquence présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80%, de préférence au moins 90%, ou encore au moins 95%, d'identité avec la séquence SEQ ID NO:1 ou avec un fragment de SEQ ID NO :1.

Il est bien entendu selon la présente invention, que ladite protéine ou ledit polypeptide, ou leurs dits fragments, s'ils ne présentent pas une identité complète avec SEQ ID NO :1 ou ses fragments, doivent posséder un pouvoir fusogène, de préférence au moins égal ou supérieur à celui de SEQ ID NO :1 ou ses fragments.

Si les fragments de la protéine ou du polypeptide de l'invention présentent une identité complète avec les fragments de SEQ ID NO :1, alors la taille de ces fragments peut être inférieure à 20 acides aminés, par exemple elle peut être d'environ 10 acides aminés, voire d'environ 5 acides aminés.

Les variations prévues selon l'invention dans la séquence polypeptidique de la protéine ou du polypeptide ou de leurs fragments comprennent les variations liées

au polymorphisme, mais aussi les modifications telles que substitution(s), délétion(s) et addition(s) susceptibles d'être apportées à ladite séquence polypeptidique pour obtenir une protéine, un polypeptide ou un fragment de ceux-ci possédant un pouvoir fusogène, en particulier au moins égal ou supérieur à celui de SEQ ID NO :1 ou ses fragments.

5 L'analyse du polymorphisme peut être réalisée par la méthode SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism), qui est une méthode électrophorétique permettant d'objectiver, à l'aide de différences de migration, la présence d'au moins une mutation discriminant deux séquences courtes (inférieures à 250 pb). Ainsi, comme illustré à la figure 4, après amplification sur ADN total à l'aide des amorces U6198 et
10 L6186 ou U 6189 et L6186, il est possible d'analyser le polymorphisme de l'enveloppe localisée sur le chromosome 7 à l'aide du jeu d'amorces représenté (U6302 à L6321), permettant de générer un ensemble de 10 fragments chevauchants de taille adéquate. Le polymorphisme de l'un des sous-fragments peut également être mis en évidence par des techniques de séquençage, de cartographie de restriction le cas échéant, ou plus
15 simplement par une technique d'hybridation sandwich de type ELOSA permettant de discriminer jusqu'à une mutation ponctuelle (Cros P. et al., demande de brevet européen EP 0 486 661).

Des exemples de séquences Env HERV-W polymorphes sont représentées à la figure 1 annexée, les séquences ADN correspondantes étant représentées à la figure
20 2. Ces figures représentent l'alignement de séquences protéiques et nucléiques obtenues par séquençage de clones issus de trois individus différents.

Par ailleurs, le polymorphisme du LTR qui dirige la transcription du gène *env* situé sur le chromosome 7 a été étudié. On observe deux groupes de LTRs 5' dont les séquences nucléiques obtenues par séquençage de deux clones provenant de deux
25 individus différents sont représentées et alignées dans la figure 3.

Un choix judicieux d'amorces a permis d'amplifier spécifiquement sur le chromosome 7, à partir d'ADN humain total, un fragment nucléaire contenant l'intégralité de l'information U3RU5-gag-pol-env-U3RU5 à l'aide des amorces U6198, L6186 ou exclusivement la séquence env-U3RU5 à l'aide des amorces U6189, L6186.
30 Une telle approche est par exemple possible en utilisant une amorce chevauchant la zone de jonction entre la séquence rétrovirale (U3 en amont, U5 en aval) et la séquence flanquante non rétrovirale contiguë. Par, exemple, l'amorce L6186 chevauche la région

U5 3' terminale et la séquence non rétrovirale avale. A partir d'un tel produit de PCR isolant la séquence d'intérêt du mélange des séquences HERV-W présentes dans le génome humain, il est possible de réaliser une analyse du polymorphisme.

De manière préférentielle, ladite protéine présente au moins l'une des caractéristiques suivantes :

- elle est codée par le gène *env* du rétrovirus endogène HERV-W ;
- elle est codée par un cadre de lecture ouvert situé sur le chromosome 7 du génome humain ;
- elle présente une séquence polypeptidique qui comprend la séquence SEQ ID NO :1, ou une séquence présentant pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80%, de préférence au moins 90%, ou encore au moins 95% d'identité avec la SEQ ID NO :1. De préférence, elle consiste en SEQ ID NO:1.

De manière préférentielle, le polypeptide présente une séquence polypeptidique qui commence à l'acide aminé 448 et se termine à l'acide aminé 538 de SEQ ID NO : 1 ou une séquence polypeptidique présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80%, de préférence au moins 90%, ou encore au moins 95% d'identité avec la séquence polypeptidique qui commence à l'acide aminé 448 et se termine à l'acide aminé 538 de SEQ ID NO:1. De préférence, il consiste en une séquence polypeptidique qui commence à l'acide aminé 448 et se termine à l'acide aminé 538 de SEQ ID NO:1. Le polypeptide qui répond à la définition ci-dessus est un élément de régulation pouvant conférer ou restituer sa capacité fusogénique à une enveloppe rétrovirale non réputée fusogène dans un test de fusion cellule-cellule.

Les cellules dudit tissu ou de ladite culture cellulaire dans lesquelles on recherche à mettre en évidence le pouvoir fusogène sont avantageusement choisies parmi les cellules osseuses, les cellules musculaires, les cellules placentaires, les cellules endothéliales, en particulier des vaisseaux sanguins, les cellules épithéliales, les cellules gliales et les cellules tumorales ou issues de lignées cellulaires tumorales.

Comme cela sera illustré dans les exemples qui suivent, la détection du pouvoir fusogène de ladite protéine ou dudit polypeptide peut être mise en œuvre selon au moins l'un quelconque des deux protocoles suivants.

Selon un premier protocole, on obtient un vecteur d'expression de ladite protéine ou dudit polypeptide à partir duquel l'expression de la protéine, du

polypeptide ou de son gène est sous la dépendance d'un promoteur, de préférence un promoteur fort ; on transfecte des cellules par le vecteur obtenu pour obtenir des cellules productrices, exprimant à leur surface ladite protéine ou ledit polypeptide; et on observe la formation de syncytia ou l'absence de formation de syncytia.

5 Selon un second protocole, on obtient un vecteur d'expression de ladite protéine ou dudit polypeptide à partir duquel l'expression de la protéine, du polypeptide ou de son gène est sous la dépendance d'un promoteur, de préférence un promoteur fort; on transfecte des cellules par le vecteur obtenu pour obtenir des cellules productrices, exprimant à leur surface ladite protéine ou ledit polypeptide; on
10 co-cultive des cellules naïves indicatrices exprimant à leur surface un récepteur de ladite protéine en présence desdites cellules productrices ; et on observe la formation de syncytia ou l'absence de formation de syncytia.

 La présente invention concerne en outre l'utilisation d'un gène ou d'un acide nucléique ou d'un fragment de gène ou d'un acide nucléique codant pour une
15 protéine ou un polypeptide tels que définis précédemment dans la description des procédés objets de l'invention, dans des conditions appropriées permettant son expression, pour préparer une composition thérapeutique ou prophylactique.

 Un autre objet de l'invention est une composition thérapeutique ou prophylactique comprenant un gène ou un acide nucléique ou un fragment de gène ou
20 d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis précédemment.

 Une telle composition peut comprendre en outre un promoteur hétérologue ou autologue, de préférence hétérologue, pour l'expression de ladite protéine ou dudit polypeptide.

25 L'invention concerne aussi les objets suivants :

 - un vecteur d'expression comprenant au moins un gène ou un acide nucléique ou un fragment de gène ou d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis précédemment, et des éléments nécessaires à son expression dans une cellule hôte ;

30 - une cellule hôte comprenant au moins un vecteur d'expression de l'invention, et

- une composition thérapeutique ou prophylactique comprenant au moins un vecteur d'expression ou une cellule hôte de l'invention.

Les différentes compositions thérapeutiques de l'invention sont en particulier destinée au traitement de cancers, tel que par destruction des cellules
5 cancéreuses au moyen de la formation de syncytia. Les différentes compositions prophylactiques de l'invention sont notamment destinées à prévenir une déficience dans l'élaboration du placenta.

Les compositions de l'invention thérapeutiques ou prophylactiques, telles que définies ci-dessus, sont avantageusement destinées à un traitement communément
10 dénommé « traitement par thérapie génique » ou « traitement par transfert de gène ».

Comme énoncé ci-dessus, les propriétés fusogènes de la protéine Env HERV-W, du polypeptide Env HERV-W ou de leurs fragments tels que définis dans la présente invention trouvent notamment une application dans le domaine de la thérapie
génique des cancers.

15 A ce jour les gènes les plus fréquemment utilisés dans la thérapie contre les cancers sont (i) les gènes qui codent pour des protéines qui augmentent l'immunogénicité des cellules tumorales, telles que les cytokines pro-inflammatoires, (ii) les gènes qui codent pour des enzymes qui rendent les cellules cancéreuses sensibles à un pro-médicament dans des systèmes gène/pro-drogue, tels que le système thymidine
20 kinase du virus Herpes Simplex/Ganciclovir ou le système cytosine désaminase/5FC.

De manière idéale, le transfert de gènes thérapeutiques devrait conduire à la fois à une destruction locale des cellules cancéreuses, à l'activation de l'immunité anti-tumorale pour éliminer les zones tumorales auxquelles les gènes thérapeutiques ne peuvent être délivrés et le traitement ne devrait pas causer de dommages aux tissus
25 cellulaires normaux de l'hôte, en particulier aux tissus des organes vitaux.

La protéine ou le polypeptide de l'invention qui comprend ou consiste en la protéine Env HERV-W ou ses fragments, en particulier un fragment qui commence à l'acide aminé 448 et se termine à l'acide aminé 538 de SEQ ID NO : 1, ou en une séquence polypeptidique présentant pour toute suite de 20 acides aminés, au moins
30 80%, de préférence au moins 90% ou encore au moins 95% d'identité avec SEQ ID NO : 1 ou un fragment de SEQ ID NO : 1 et en particulier le fragment identifié ci-dessus, sous la dépendance d'un promoteur hétérologue ou autologue capable

d'induire son expression répond aux critères définis ci dessus via la formation de syncytia. Ces syncytia se forment à partir de cellule(s) transfectée(s) par un processus de fusion de cellule à cellule.

Dans un mode de réalisation en vu d'optimiser ses caractéristiques thérapeutiques, la protéine ou le polypeptide de l'invention ou tout fragment est éventuellement fusionné avec d'autres protéine(s) ou fragment(s) de protéine(s), même si intrinsèquement il répond aux critères définis précédemment. A contrario, tout ou partie de la protéine, et en particulier le polypeptide dont la séquence peptidique comprend ou consiste en la séquence qui commence à l'acide aminé 448 et se termine à l'acide aminé 538 de SEQ ID NO : 1, peut être fusionné à d'autres protéines en vue de leur conférer des propriétés particulières. La protéine ou le polypeptide de l'invention ou son fragment est capable d'induire la formation de syncytia à un pH voisin de la neutralité ou à pH neutre. Typiquement le vecteur d'expression ou plasmide sera adapté pour permettre l'expression de la protéine, du polypeptide ou fragment induisant la formation de syncytia, de telle sorte que lorsqu'il est exprimé la protéine, le polypeptide ou fragment puisse induire la fusion des cellules transfectées avec d'autres cellules humaines non transfectées. Il est souhaitable que la protéine ou le polypeptide de l'invention soit exprimé indépendamment d'autres composants viraux, à moins que ceux ci soient utiles à la vectorisation.

Aussi, la présente invention a pour objet un gène ou un acide nucléique, ou un fragment de gène ou d'un acide nucléique, recombinant codant pour une protéine ou un polypeptide ou un fragment de l'invention qui induit la formation de syncytia par fusion de cellules transformées et de cellules malignes cibles et son utilisation dans le domaine de la thérapie de maladies malignes, telles que les cancers.

L'invention concerne également une méthode de traitement d'une maladie maligne chez un patient qui consiste à administrer au patient le gène ou un acide nucléique, ou un fragment de gène ou d'un acide nucléique, recombinant codant pour une protéine ou un polypeptide ou un fragment de l'invention qui induit la formation de syncytia par fusion de cellules transformées et de cellules malignes cibles.

Le gène ou l'acide nucléique, ou le fragment de gène ou d'acide nucléique est introduit *in vitro* dans des cellules humaines appropriées, telles que des cellules de lignées continues immortalisées, par des techniques standards connues de l'homme du

métier, telle que transfection, transduction ou transformation, et les cellules ainsi transformées sont ensuite introduites chez le patient où elles peuvent exercer leur propriétés fusogènes.

Le gène ou l'acide nucléique, ou le fragment de gène ou d'acide nucléique de l'invention peut être utilisé de différentes manières pour le traitement de cancers, en particulier pour le traitement de tumeurs solides ou molles. Les cellules cibles peuvent être transformées *ex vivo* ou *in vivo* par les vecteurs (plasmides) codant pour le polypeptide de l'invention.

Les propriétés fusogènes de la protéine Env HERV-W, du polypeptide Env HERV-W ou de leurs fragments tels que définis dans la présente invention trouvent également une application dans le domaine de la prophylaxie pour prévenir une déficience dans l'élaboration du placenta et pallier des échecs de grossesse.

Le gène ou l'acide nucléique ou leurs fragments tels que définis dans l'invention peuvent donc être utilisé pour différents effets thérapeutiques ou prophylactiques, le but ultime étant soit (i) de détruire les cellules cibles par formation de syncytia induisant une mort cellulaire des cellules cibles par un processus de mort différent de la mort cellulaire par apoptose, soit (ii) d'induire ou de favoriser la formation de syncytia, par exemple pour pallier une déficience dans la formation des syncytiotrophoblastes lors de la grossesse, ou pour prévenir une déficience dans la formation naturelle de tout autre type de syncytia, ladite déficience étant associée à une pathologie.

L'invention concerne également l'utilisation de la protéine Env HERV-W ou d'un fragment de Env HERV-W, tels que définis précédemment, à la surface d'un vecteur de thérapie génique comprenant, entre autres, un gène ou une séquence d'acide nucléique ou un oligonucléotide d'intérêt thérapeutique susceptible d'être exprimé dans une cellule cible ou de s'hybrider à une séquence nucléotidique complémentaire d'une cellule cible, ladite protéine Env HERV-W ou ledit fragment de cette protéine interagissant avec son récepteur cellulaire décrit ci-dessus, favorisant ainsi l'introduction du gène ou de la séquence d'acide nucléique ou de l'oligonucléotide d'intérêt thérapeutique dans la cellule cible.

Aussi, l'invention concerne un vecteur de thérapie génique comprenant une protéine ou un polypeptide ou un fragment d'enveloppe d'un rétrovirus endogène

humain, ladite protéine ou ledit polypeptide présentant une séquence polypeptidique qui comprend la séquence SEQ ID NO : 1 ou un fragment de SEQ ID NO :1, en particulier un fragment dont la séquence peptidique comprend ou consiste en la séquence qui commence à l'acide aminé 448 et se termine à l'acide aminé 538 de SEQ ID NO : 1, ou une séquence présentant pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80%, de préférence au moins 90% ou encore au moins 95% d'identité avec la séquence SEQ ID NO :1 ou avec un fragment de SEQ ID NO :1, en particulier tel que défini ci-dessus. De préférence, le vecteur de thérapie génique de l'invention comprend la séquence SEQ ID NO :1. Dans un mode de réalisation particulier de l'invention le vecteur de thérapie génique précédemment cité consiste en un vecteur rétroviral classique de type MLV ou en un vecteur lentiviral pseudotypés par tout ou partie de la protéine d'enveloppe de HERV-W telle que définie ci-dessus, ou encore en un vecteur synthétique portant à sa surface tout ou partie de la protéine Env HERV-W telle que définie ci-dessus conférant les propriétés de ciblage cellulaire et de fusion de la membrane plasmatique.

L'invention concerne encore un vecteur de thérapie génique comprenant à sa surface le récepteur de la protéine identifiée en SEQ ID NO :1, notamment pour cibler des cellules produisant la protéine identifiée en SEQ ID NO :1 de façon constitutive ou induite.

Les séquences d'acides nucléiques et/ou oligonucléotides d'intérêt thérapeutique (anti-sens ou codant pour une protéine) permettent notamment de cibler les cellules dans lesquelles un gène est exprimé.

Les séquences d'acides nucléiques ou les oligonucléotides anti-sens sont capables d'interférer spécifiquement avec la synthèse d'une protéine cible, par inhibition de la formation et/ou du fonctionnement du polysome, selon le positionnement de l'anti-sens dans l'ARNm de la cible. Donc, le choix fréquent de la séquence entourant le codon d'initiation de la traduction comme cible pour une inhibition par une séquence d'acide nucléique anti-sens ou par un oligonucléotide anti-sens vise à prévenir la formation du complexe d'initiation. D'autres mécanismes dans l'inhibition par des oligonucléotides anti-sens impliquent une activation de la ribonucléase H qui digère les hybrides oligonucléotide anti-sens/ARNm ou une interférence au niveau de sites d'épissage par des oligonucléotides anti-sens dont la

cible est un site d'épissage de l'ARNm. Les oligonucléotides anti-sens sont également complémentaires de séquences ADN et peuvent donc interférer au niveau de la transcription par la formation d'une triple hélice, l'oligonucléotide anti-sens s'appariant par des liaisons hydrogène dites de Hoogsteen au niveau du grand sillon de la double
5 hélice d'ADN. Dans ce cas particulier, on parle plus précisément d'oligonucléotides antigènes. Il est bien entendu que les séquences d'acides nucléiques ou oligonucléotides anti-sens peuvent être strictement complémentaires de la cible ADN ou ARN à laquelle ils doivent s'hybrider, mais aussi non strictement complémentaires à la condition qu'ils s'hybrident à la cible. De même, il peut s'agir d'oligonucléotides
10 anti-sens non modifiés ou modifiés au niveau des liaisons inter-nucléotidiques. Toutes ces notions font partie des connaissances générales de l'homme de l'art.

La présente invention concerne donc une composition thérapeutique comprenant, entre autres, un vecteur de thérapie génique, la protéine Env HERV-W ou un fragment de cette protéine telle que définie précédemment, et une séquence d'acide
15 - nucléique ou oligonucléotide anti-sens tels que définis ci-dessus.

La protéine Env HERV-W ou un de ses fragments est également utilisé comme vecteur thérapeutique pour le transfert d'un gène d'intérêt thérapeutique dans une cellule cible et dans la formulation d'une composition thérapeutique comprenant au moins un vecteur de thérapie génique, la protéine Env HERV-W ou un fragment de
20 cette protéine telle que définie précédemment, et un gène d'intérêt thérapeutique ainsi que les éléments permettant l'expression dudit gène d'intérêt thérapeutique. Les gènes d'intérêt thérapeutique peuvent être non mutés ou mutés. Ils peuvent également consister en des acides nucléiques modifiés de sorte qu'il ne leur est pas possible de s'intégrer dans le génome de la cellule cible ou des acides nucléiques stabilisés à l'aide
25 d'agents, tels que la spermine.

Par éléments assurant l'expression dudit gène d'intérêt thérapeutique *in vivo* on fait notamment référence aux éléments nécessaires pour assurer l'expression dudit gène thérapeutique, après son transfert dans une cellule cible. Il s'agit notamment des séquences promotrices et/ou des séquences de régulation efficaces dans ladite
30 cellule, et éventuellement les séquences requises pour permettre l'expression à la surface des cellules cibles d'un polypeptide. Le promoteur utilisé peut être un promoteur viral, ubiquitaire ou spécifique de tissu ou encore un promoteur synthétique.

A titre d'exemple, on mentionnera les promoteurs, tels que les promoteurs des virus RSV (Rous Sarcoma Virus), MPSV, SV40 (Simian Virus), CMV (Cytomegalovirus) ou du virus de la vaccine. Il est en outre possible de choisir une séquence promotrice spécifique d'un type cellulaire donné, ou activable dans des conditions définies. La
5 littérature procure un grand nombre d'informations relatives à de telles séquences promotrices.

Dans un autre mode de réalisation, on peut utiliser dans une composition thérapeutique une cellule exprimant la protéine Env HERV-W ou un fragment de cette protéine tels que définis précédemment comme véhicule de gène(s) de grande taille
10 grâce aux propriétés fusogènes de la protéine ou de ses fragments qui permettent la fusion de la cellule vecteur avec une cellule hôte déficiente pour un ou des gènes déterminé(s), permettant ainsi de compenser le ou les gène(s) déficient(s) (exemple : dystrophine).

L'invention concerne donc également une telle cellule et son utilisation
15 comme vecteur cellulaire.

Les propriétés ou pouvoir fusogène(s) de la protéine ou du polypeptide de l'invention ou de leurs fragments sont également utilisées dans un procédé pour tester l'efficacité et sélectionner des drogues ou substances médicamenteuses ou des systèmes gène/pro-droque susceptibles d'intervenir qualitativement et/ou
20 quantitativement sur leur pouvoir fusogène par mise en contact de ladite drogue ou substance médicamenteuse ou dudit système gène/pro-droque avec des cellules d'une culture cellulaire exprimant ladite protéine ou ledit polypeptide ou ledit fragment et, observation d'une régression ou d'une disparition dans la formation de syncytia, étant entendu que la formation de syncytia à l'état naturel est associée à un état
25 pathologique. A titre d'exemple, on peut citer les phénomènes hémorragiques, la destruction ou l'altération des cellules neuronales, la destruction ou l'altération exacerbée des ostéoblastes.

L'invention concerne aussi un procédé pour la sélection de drogues ou substances médicamenteuses ou de systèmes gène/pro-droque susceptibles d'intervenir
30 qualitativement et/ou quantitativement sur le pouvoir fusogène d'une protéine ou d'un polypeptide ou d'un fragment tel que défini précédemment. Selon ce procédé, on met en contact ladite drogue ou substance médicamenteuse ou ledit système gène/pro-

drogue avec des cellules d'une culture cellulaire exprimant ladite protéine ou ledit polypeptide ou ledit fragment et, on observe une régression ou une disparition dans la formation de syncytia.

L'invention concerne également l'utilisation d'au moins une séquence
5 d'acide nucléique ou d'au moins un oligonucléotide anti-sens répondant aux critères définis précédemment et susceptible de s'hybrider et d'interférer spécifiquement avec la synthèse de la protéine Env HERV-W et une composition thérapeutique comprenant, entre autres, ladite séquence d'acide nucléique ou oligonucléotide anti-sens dans le but d'obtenir *in vivo* une régression ou une disparition de syncytia associés à un état
10 pathologique.

Dans le but d'obtenir *in vivo* une régression de la formation de syncytia ou une disparition de syncytia associés à un état pathologique, on prépare une composition thérapeutique comprenant, entre autres, un ligand susceptible de reconnaître le récepteur identifié précédemment et d'inactiver ou inhiber le processus de formation de
15 syncytia ou une composition comprenant un gène codant pour un ligand susceptible de s'exprimer *in vivo* dans une cellule cible ou dans un tissu cellulaire cible déterminé, ledit gène étant sous la dépendance des éléments nécessaires assurant son expression,, après son transfert dans la cellule ou le tissu cellulaire cible.

Ainsi, par ligand on entend toute molécule qui est capable de reconnaître
20 ledit récepteur et/ou d'inhiber sa fonction. Il peut s'agir, entre autres, d'un anticorps monoclonal ou d'un anticorps polyclonal ou d'un fragment d'anticorps monoclonal ou d'anticorps polyclonal. Il peut s'agir également d'une molécule inhibitrice de la fonction du récepteur dont la constante d'affinité serait plus grande que celle de la protéine Env HERV-W pour sa liaison et fixation au récepteur.

25 La production d'anticorps polyclonaux et monoclonaux fait partie des connaissances générales de l'homme du métier. On peut citer à titre de référence Köhler G. et Milstein C. (1975) : Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature 256 :495-497 et Galfre G. et al. (1977) Nature, 266 : 522-550 pour la production d'anticorps monoclonaux et Roda A., Bolelli G.F. : Production
30 of high-titer antibody to bile acids, Journal of Steroid Biochemistry, Vol. 13, pp 449-454 (1980) pour la production d'anticorps polyclonaux. Pour la production d'anticorps monoclonaux, un immunogène peut être couplé à de l'hémocyanine de Lymphet

Keyhole (peptide KLH) comme support pour l'immunisation ou à de l'albumine sérique (peptide SA). Les animaux sont soumis à une injection d'immunogène en utilisant de l'adjuvant complet de Freund. Les sérums et les surnageants de culture d'hybridome issus des animaux immunisés sont analysés pour leur spécificité et leur sélectivité en utilisant des techniques classiques, telles que par exemple des tests ELISA ou de Western Blot. Les hybridomes produisant les anticorps les plus spécifiques et les plus sensibles sont sélectionnés. Des anticorps monoclonaux peuvent également être produits *in vitro* par culture cellulaire des hybridomes produits ou par récupération de liquide d'ascite, après injection intrapéritonéale des hybridomes chez la souris. Quelque soit le mode de production, en surnageant ou en ascite, les anticorps sont ensuite purifiés. Les méthodes de purification utilisées sont essentiellement la filtration sur gel échangeur d'ions et la chromatographie d'exclusion ou l'immunoprécipitation. Un nombre suffisant d'anticorps sont criblés dans des tests fonctionnels pour identifier les anticorps les plus performants. La production *in vitro* d'anticorps, de fragments d'anticorps ou de dérivés d'anticorps, tels que des anticorps chimères produits par génie génétique est bien connue de l'homme du métier.

Plus particulièrement, par fragment d'anticorps on entend les fragments F(ab)₂, Fab, Fab', sFv (Blazar et al., 1997, Journal of Immunology 159 : 5821-5833 et Bird et al., 1988, Science 242 : 423-426) d'un anticorps natif et par dérivé on entend, entre autres, un dérivé chimérique d'un anticorps natif (voir par exemple Arakawa et al., 1996, J. Biochem 120 : 657-662 et Chaudray et al., 1989, Nature 339 : 394-397).

Comme évoqué précédemment la thérapie génique ouvre la possibilité d'exprimer *in vivo* de tels ligands par l'administration de compositions thérapeutiques comprenant au moins un gène codant pour un tel ligand. Un tel gène d'intérêt thérapeutique code notamment (i) soit pour au moins un anticorps polyclonal ou monoclonal ou un fragment d'anticorps monoclonal ou polyclonal ou encore pour un anticorps transmembranaire natif, ou un fragment d'un tel anticorps, pour autant que l'anticorps ou fragment d'anticorps soit exprimé *in vivo* à la surface d'une cellule cible ou de cellules cibles d'un tissu et soit capable de reconnaître et de se lier audit récepteur, (ii) soit pour au moins une molécule inhibitrice comme décrit ci-dessus.

Par cellules cibles ou cellules cibles d'un tissu, telles que définies ci-dessus, on entend (i) soit des cellules au niveau desquelles on veut intervenir pour

prévenir ou inhiber la formation de syncytia, (ii) soit des cellules autres mais qui sont susceptibles d'exprimer le ligand et par voie de conséquence d'inhiber et/ou de bloquer l'activité fonctionnelle du récepteur.

Par élément assurant l'expression *in vivo* dudit gène, on fait notamment
5 référence aux éléments nécessaires pour assurer son expression, après transfert dans une cellule cible. Il s'agit notamment des séquences promotrices et/ou des séquences de régulation efficaces dans ladite cellule et éventuellement des séquences requises pour permettre l'expression à leur surface d'un polypeptide ou d'une molécule inhibitrice, tel qu'évoqué ci-dessus. Le promoteur utilisé peut être un promoteur viral,
10 ubiquitaire ou spécifique de tissu ou encore un promoteur synthétique. Des exemples de tels promoteurs ont été décrits précédemment.

Par anticorps transmembranaire, on entend un anticorps dont au moins la région fonctionnelle capable de reconnaître et de se fixer au récepteur est exprimée à la surface des cellules cibles pour permettre la reconnaissance et la fixation. De tels
15 anticorps peuvent consister en des polypeptides de fusion comprenant une séquence d'acides aminés définissant la région fonctionnelle et une séquence d'acides aminés définissant un polypeptide transmembranaire qui permet l'ancrage au sein de la bicouche lipidique membranaire des cellules cibles ou à la surface externe de cette bicouche lipidique. Des séquences nucléiques codant pour de tels anticorps
20 transmembranaires sont décrites dans la littérature.

Par gène ou séquence d'acide nucléique ou leurs fragments, on entend (i) un gène ou un acide nucléique natif isolé ou leurs fragments isolés obtenus par coupure enzymatique, ou (ii) un gène ou acide nucléique ou leurs fragments obtenu(s) par synthèse chimique à l'aide de synthétiseurs automatiques, tels que les synthétiseurs
25 commercialisés par la société Applied Biosystems.

Par cellules tumorales, on entend (i) des cellules de lignées cellulaires immortalisées ou (ii) des cellules primaires tumorales prélevées chez un patient.

Par promoteur autologue, on entend un LTR 5' de HERV-W, à la condition qu'il soit fonctionnel et par promoteur hétérologue on entend tout promoteur
30 n'appartenant pas à la famille de HERV-W, d'origine virale, rétrovirale ou cellulaire, éventuellement modifié, à la condition qu'il soit fonctionnel. Avantagusement, le

promoteur autologue ou hétérologue est un promoteur fort c'est-à-dire qu'il est capable d'induire une expression quantitativement importante de la protéine ou du polypeptide.

Le pouvoir fusogène de la protéine Env HERV-W peut également être utilisé pour favoriser le processus d'adhésion cellulaire dans la cas de greffes
5 hétérologues ou homologues ou dans des processus de réparation cellulaire.

Exemple 1 :

Lignées cellulaires:

La lignée TELCeB6 (Cosset et al., Journal of Virology, 69 (12) : 7430-
10 7436 (1995)) dérive de la lignée TELac2 après transfection et sélection clonale d'un plasmide d'expression destiné à produire des protéine Gag et Pol de type MoMLV (virus de la leucémie murine de Moloney). La lignée TELac2 dérive initialement des cellules humaines de rhabdomyosarcome TE671 (ATCC CRL 8805) et exprime le vecteur rétroviral rapporteur nlsLacZ (Takeuchi et al., Journal of Virology, 68 (12) :
15 8001-8007 (1994)). La production de particules rétrovirales infectieuses par les cellules TELCeB6 dépend des vecteurs d'expression d'enveloppe transfectés.

Ces cellules sont cultivées en milieu DMEM (Dulbecco modified Eagle medium - Life Technologies) avec 10% de sérum de veau foetal (Life Technologies). D'une manière générale, ce milieu a été utilisé pour tous les autres types cellulaires, *i.e.*
20 les cellules TE671 (ATCC CRL 8805 - rhabdomyosarcome humain), A-431 (ATCC CRL-1555 - tumeur solide, carcinome épidermoïde humain), HeLa (ATCC CCL-2), COS (ATCC CRL-1651), PAE (cellules endothéliales d'aorte de porc), XC (ATCC CCL-165 - sarcome de rat), NIH-3T3 et QTB (ATCC CRL-1708).

Construction des vecteurs d'expression d'enveloppe :

25 Le plasmide pHCMV a été utilisé pour l'expression de *env* HERV-W. Le plasmide FBASALF-ARless a été utilisé en qualité de témoin positif de fusion; il produit une forme hautement fusogénique de la glycoprotéine d'enveloppe MLV amphotrope, modifiée par introduction d'un codon stop avant le premier acide aminé du peptide intracytoplasmique p2-R (Rein et al., Journal of Virology, 68 (3) : 1773-1781
30 (1994)). *env* HERV-W cloné en anti-sens dans le plasmide pHCMV a été utilisé comme témoin négatif.

Transfection et tests de fusion de cellule à cellule (coculture) :

Les plasmides d'expression des glycoprotéines d'enveloppe sont transfectés dans les cellules TELCeB6 par précipitation au phosphate de calcium (Cosset et al., Journal of Virology, 69 (10) : 6314-6322 (1995)). Les cellules TELCeB6 confluentes exprimant Env sont fixées au Glutaraldéhyde à 0,5% en PBS, 24 h. après
5 transfection. Une coloration par des solutions de May-Grünwald et Giemsa (MERCK) est alors effectuée selon les recommandations du fournisseur. Elle colore les noyaux en violet et les cytoplasmes en mauve et permet de visualiser les syncytia.

Pour les expériences de coculture, les cellules transfectées sont décrochées du support, comptées puis ré-ensemencées à concentration égale (3×10^5 cellules/puit)
10 en plaques 6 puits. Des cellules fraîches indicatrices sont alors ajoutées aux cellules transfectées à raison de 10^6 cellules par puit et la co-culture est poursuivie pendant 24 h. Une coloration XGal (5-bromo-4chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside peut alors être effectuée pour colorer le noyau des cellules TELCeB6 (Cosset et al., Journal of Virology, 69 (10) : 6314-6322 (1995)). Elle est suivie d'une coloration par des
15 solutions de May-Grünwald et Giemsa (MERCK) effectuée selon les recommandations du fournisseur.

La majorité des syncytia est observable 18 à 24 heures après le début de la transfection ; le décollement progressif des cellules ne permet plus d'observation, ni de coloration 36 heures après la transfection. La fusion observée correspond à une fusion
20 "from within", c'est-à-dire à une fusion de cellule-à-cellule, à partir d'une cellule exprimant l'enveloppe, par opposition à une fusion "from without" qui correspond à une formation de syncytia consécutive à une fusion virion-cellule(s).

Le tableau I ci-après rassemble les résultats obtenus concernant la capacité de fusion de cellule à cellule de Env HERV-W par transfection directe, comparée à
25 celle de l'enveloppe témoin ARless. Les cellules TELCeB6 et TE671 correspondent à des lignées d'origine humaine. Les cellules COS sont des cellules de rein de singe vert. Les cellules XC sont des cellules de rat.

Tableau I

Enveloppe	index ^a de fusion sur les cellules			
	TELCeB6	TE671	COS	XC
ARless	33	8,6	inn.	40
HERV-W	61	24,7	3,6	0

5 ^aL'index de fusion correspond au pourcentage $(N-S)/T$, où N est le nombre de noyaux en syncytia, S est le nombre de syncytia et T est le nombre total de noyaux comptés. inn. signifie innombrables, organisés en "réseau".

Le tableau I montre que les résultats sont au moins aussi importants pour Env HERV-W que pour le témoin sur les cellules d'origine humaine. Ils sont moindres
10 sur les cellules simiennes. Env HERV-W n'induit pas la formation de syncytia sur des cellules de rat.

Le tableau II ci-après rassemble les données observées dans des expériences de coculture de cellules indicatrices avec des cellules TELCeB6 transfectées par pHCMV-*env* HERV-W. Le type, l'origine et l'espèce des cellules
15 indicatrices sont indiqués. La formation de syncytia est indiquée par les mentions oui/non.

5

Tableau II

Espèce	Type cellulaire	Origine	Fusion en co-culture avec TELCeB6
Homme	TE671	Rhabdomyosarcome	Oui
	A431	Carcinome épidermoïde	Oui
	HeLa	Carcinome épithélioïde	Oui
Singe	COS	Type fibroblastique	Oui
Porc	PAE	Endothélium	Oui
Rat	XC	Sarcome	Non
Souris	3T3	Fibroblastique	Non
Caille	QT6	Fibrosarcome	Non

Le tableau II détaille les résultats des expériences de coculture en fonction des lignées cellulaires testées. On observe des syncytia dans des cellules humaines de rhabdomyosarcome (TE671), de carcinome épidermoïde (A431) et de carcinome épithélioïde (HeLa), ainsi que dans des cellules de singe de type fibroblastique (COS), des cellules de porc d'endothélium (PAE) et des cellules de souris de type fibroblastique (3T3). Le fait que l'enveloppe endogène humaine Env HERV-W soit capable de fusionner dans des cellules de porc peut poser des problèmes dans le cadre de la transplantation d'organes (xénotransplantation).

Exemple 2 :

Amplification conjointe puis sélective de la LTR et de l'enveloppe:

Afin d'étudier le polymorphisme de la région codante de l'enveloppe et de la région promotrice U3 de la LTR 5' associée, situées sur le chromosome 7, une amplification spécifique d'un fragment de 10kb est réalisée grâce à un couple d'amorces spécifiques. En effet, sachant que la famille HERV-W comporte de nombreuses copies

non codantes et en particulier un nombre important de LTR, cette stratégie permet d'amplifier spécifiquement et conjointement la région *env* et sa séquence promotrice (LTR5') située en amont, exclusivement sur le chromosome 7. On utilise pour cela une amorce U6198 s'hybridant sur une séquence spécifique située en amont de la LTR 5'

5 sur le chromosome 7, et une amorce L6186 s'hybridant de façon chevauchante sur la région U5 du LTR 3' et le gène cellulaire adjacent, sur ce même chromosome. La longue PCR (ou LD-PCR) est réalisée dans les conditions suivantes, 1 x 5 min. à 94°C, 10 x (10 sec à 94°C, 30 sec à 55°C, 8 min. à 68°C), 25 x (10 sec à 94°C, 30 sec à 55°C, 8 min. à 68°C + 10 sec /cycle), 1 x 7 min. à 68°C, en présence de tampon

10 d'amplification (50 mM Tris HCL pH 9,0 à 25°C, 15mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Triton X-100); 1,5 mM MgCl₂, 0,25mM de chaque dNTP, 330 nM de chaque amorce (U6198 et L6186), 1U d'ADN polymérase ainsi que 200ng de matrice (ADN génomique) dans un volume final de 50ml.

A partir de ce produit PCR de 10kb dilué, une PCR nichée "*env*" ainsi

15 qu'une PCR nichée "LTR" sont effectuées, afin d'objectiver la présence ou non d'un polymorphisme de ces deux régions. La dilution permet une amplification spécifique à partir du produit de LD-PCR et non du matériel génomique de départ. La PCR nichée "*env*" est réalisée grâce aux amorces U6189 et L6186, l'amorce U6189 étant celle employée pour la LD-PCR, l'amorce U6189 étant située en amont de l'ATG de *env*. La

20 région U3 du LTR 5' est amplifiée par le couple d'amorce U6460 et L5643. L'amorce U6460 s'hybride en amont de la LTR 5' tandis que l'amorce L5643 s'hybride dans le domaine R de la LTR 5'. Les PCR nichées sont réalisées dans les conditions suivantes, 1 x 5 min. à 94°C, 30 x (1 min. à 94°C, 1 min. à 53°C, 3 min. à 72°C), 1 x 7 min. à 72°C, en présence de tampon d'amplification (10 mM Tris HCL pH 8,3, 50mM KCl),

25 1,5 mM MgCl₂, 0,25mM de chaque dNTP, 330 nM de chaque amorce, 1,25U d'ADN polymérase, un aliquot du produit d'amplification de la LD-PCR, dans un volume final de 50ml.

Analyse du polymorphisme:

Afin d'objectiver la présence ou non d'un polymorphisme, les produits des

30 PCR nichés peuvent être analysés de différentes façons, en particulier le séquençage ou l'analyse par la technique SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

permettant de mettre en évidence la présence d'au moins une mutation entre deux séquences courtes d'une taille moyenne de 250pb.

Polymorphisme du gène *env*: l'utilisation de 20 amorces (10 amorces sens paires: 6302 à 6320 et 10 amorces anti-sens impaires: 6303 à 6321) permet le
5 séquençage de la région codante de l'enveloppe à partir du produit PCR nichée
enveloppe. Ces amorces peuvent également être utilisées pour une analyse du
polymorphisme par SSCP. A titre d'exemple, les séquences des gènes d'enveloppe de
trois donneurs sains étiquetés D6, D10 et D21 sont illustrées à la figure 2. Ces
séquences montrent l'existence d'un faible taux de polymorphisme. Si on utilise la
10 séquence d'enveloppe du donneur D6 comme référence arbitraire, la séquence de
l'enveloppe du donneur D21 possède une mutation en position 386 (T386C), le
remplacement de la thymine par la cytosine induisant un changement d'acide aminé de
valine en alanine (V128A en numérotation protéique). De même, la séquence du gène
de l'enveloppe du donneur D10 présente deux mutations par rapport à la séquence du
15 donneur D6, en position 671 (T671C) et 920 (G920A), induisant deux changements
d'acides aminés, respectivement de valine en alanine (V224A en numérotation
protéique) et de sérine en asparagine (S306N en numérotation protéique). Ces
séquences illustrent l'existence d'un polymorphisme. Le séquençage de 12 ADN de
patients a été réalisé et nous a permis d'observer un faible taux de polymorphisme entre
20 les ADN testés. Par exemple, la comparaison des séquences issues de deux individus
notés 10 et 21 montre la présence de trois bases de différence en acides nucléiques sur
les 1617 bases du gène, ce qui correspond à un taux de polymorphisme de 0,19%. Deux
mutations sont situées sur la séquence de l'ADN 10 (T671C et G920A) et une sur la
séquence de l'ADN 21 (T386C). La séquence de l'individu 6 sert de référence. Cette
25 même analyse au niveau protéique permet d'observer 3 acides aminés mutés pour
l'enveloppe entière comportant au total 538 acides aminés, soit un taux de
polymorphisme de 0,56%. Les deux mutations de la séquence issue de l'individu 10
sont V224A et S306N et celle de la séquence issue de l'individu 21 est V128A.

Polymorphisme de la région promotrice U3 de la LTR5' associée au gène
30 d'enveloppe: le séquençage du domaine U3 du LTR 5' est réalisé grâce aux 2 amorces
précédemment utilisées pour la PCR nichée LTR. A titre d'exemple, les séquences de la
région U3 de la LTR5' (associée au gène de l'enveloppe) de deux des donneurs sains

(étiquetés D6 et D21) pour lesquels l'enveloppe a par ailleurs été séquencée sont illustrées à la figure 3. Ces séquences montrent l'existence d'un taux de polymorphisme plus important que pour le gène de l'enveloppe. On notera en particulier les variations aux positions 210 (T pour D6, C pour D21), 211 (G pour D6, A pour D21), 229 (A pour D6, G pour D21), 231 (T pour D6, C pour D21), 232 (C pour D6, A pour D21)

Les séquences des amorces utilisées pour la PCR, le SSCP et la séquençage sont illustrées dans le tableau III ci-dessous.

Tableau III

NOM :	SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES:
	Amorces PCR longue
U6198 :	5'- CAA-AAC-GCC-TGG-AGA-TAC-AGC-AAT-TAT-C-3'
L6186 :	5'- GCA-CCC-TCA-TGG-TTG-TGT-TAC-TTG-G-3'
	Amorces PCR nichée <i>env</i>
U6189 :	5'- CTG-AAA-ATC-CAG-GAG-ACA-ACG-CTA-GC-3'
L6186 :	5'- GCA-CCC-TCA-TGG-TTG-TGT-TAC-TTG-G-3'
	Amorces PCR nichée LTR 5'
U6460 :	5'- TTG-GTA-CCC-AAA-ACG-CCT-GGA-GAT-ACA-GCA-ATT-ATC-3'
L5643 :	5'- AAC-TCG-AGT-GAA-ATA-GCA-TGA-AAA-CAG-AG-3'
	Amorces SSCP et séquençage <i>env</i> :
U6302 :	5'- AGG-AAA-GTA-ACT-AAA-ATC-ATA-AAT-C-3'
L6303 :	5'- GGT-TCC-CTT-AGA-AAG-ACT-CC-3'
U6304 :	5'- AAT-ATT-GAT-GCC-CCA-TCG-TAT-A-3'
L6305 :	5'- CCA-GTT-TGG-GTG-AAG-TAA-GTC-3'

U6306 :	5'- GGA-GGA-CTT-GGA-GTC-ACT-GTC-3'
L6307 :	5'- AGG-CGA-GTA-TGG-GTA-CGG-AG-3'
U6308 :	5'- GGA-CTA-GAT-CTC-TCA-AAA-CTA-CA-3'
L6309 :	5'- ACG-GAA-GTG-GTG-TTT-ATT-TCT-G-3'
U6310 :	5'- CCT-GAA-CAA-TGG-AAC-AAC-TTC-3'
L6311 :	5'- ATT-CCT-GAG-GGT-AGG-CAG-AC-3'
U6312 :	5'- GGT-AAC-TCC-TCC-CAC-ACA-AA-3'
L6313 :	5'- GAA-TGG-GTA-CTC-TTT-TGT-TGC-3'
U6314 :	5'- TAC-AGT-TAT-GTC-ATA-TCT-AAG-CC-3'
L6315 :	5'- TAA-GTT-GAT-CTT-GCA-AGG-TGA-C-3'
U6316 :	5'- CTA-AAT-GGG-GAC-ATG-GAA-CG-3'
L6317 :	5'- TAT-TCG-ATC-TGG-AAT-TTC-TTC-AAC-3'
U6318 :	5'- CAA-TCC-GGA-ATC-GTC-ACT-GA-3'
L6319 :	5'- AGA-CAA-AGT-TAA-CAA-GGA-GGT-TC-3'
U6320 :	5'- ACT-CCT-CTT-TGG-ACC-CTG-TAT-C-3'
L6321 :	5'- GAG-GTT-GGC-CGA-CCA-CCG-3'

U fait référence à des amorces sens et L fait référence à des amorces réverses.

Exemple 3 :

Afin de déterminer le récepteur reconnu par la glycoprotéine d'enveloppe de HERV-W parmi les récepteurs connus comme étant exprimés dans les cellules humaines, c'est à dire PiT-2 (le récepteur des MLV amphotropes), PiT-1 (le récepteur des GALV -gibbon ape leukemia virus et FeLV-B -feline leukemia virus type B) et hATB° (le récepteur des rétrovirus mammifères de type D également reconnu par le rétrovirus RD114), des tests d'interférence ont été réalisés. Pour cela, des cellules TELCeB6 ont été transfectées, soit avec le plasmide d'expression codant pour l'enveloppe HERV-W, soit avec le plasmide d'expression exprimant l'ARN messager anti-sens du gène codant pour l'enveloppe HERV-W, soit avec le plasmide d'expression codant pour un variant hyperfusogénique de l'enveloppe MLV amphotrope nommé ARless. Ces cellules, appelées "cellules productrices" ont ensuite été co-cultivées avec des cellules humaines, dites "cellules indicatrices", exprimant le récepteur de

l'enveloppe HERV-W, et qui expriment, de plus, de manière stable, soit l'enveloppe du GALV, soit l'enveloppe du MLV amphotrope, soit l'enveloppe du RD114. L'expression des ces diverses glycoprotéines d'enveloppe sur ces cellules est capable de reconnaître les récepteurs correspondants, de les bloquer et donc de diminuer leur capacité à interagir avec une glycoprotéine d'enveloppe rétrovirale correspondante, mais exprimée de manière exogène, à la surface des cellules "productrices". Ainsi, si lors des tests de fusion par co-culture, on observe une diminution dans la formation de syncytia pour un type cellulaire indicateur bloquant un de ces récepteurs par comparaison à la cellule indicatrice parentale pour laquelle l'ensemble des trois récepteurs potentiels est pleinement accessible, on pourra en déduire la nature du récepteur reconnu par l'enveloppe exprimée sur la cellule productrice. Après deux jours de co-culture, les cellules ont été fixées, colorées, et les indices de fusion déterminés. Les résultats sont présentés dans le tableau IV ci-dessous.

Tableau IV

Protéine d'enveloppe exprimée dans les cellules productrices.	Protéines d'enveloppe exprimées dans les cellules indicatrices.			
	Témoin	MLV-A	GALV	RD114
ARless	+	-	+	+
anti-sens HERV-W	-	-	-	-
HERV-W	+	+	+	-

- signifie une absence de syncytia et + signifie la présence de syncytia

Témoin signifie qu'il n'y a pas de protéine d'enveloppe exprimée dans cette cellule.

Ces résultats permettent de déduire que la glycoprotéine d'enveloppe de HERV-W reconnaît le récepteur hATB^o des rétrovirus mammifères de type D. En effet, alors que cette enveloppe est fusogénique pour les cellules indicatrices parentales ou pour les cellules indicatrices exprimant, soit l'enveloppe MLV-A, soit l'enveloppe GALV, on n'observe pas de syncytia quand les cellules productrices exprimant la

glycoprotéine d'enveloppe de HERV-W sont co-cultivée avec les cellules indicatrices exprimant l'enveloppe RD114.

Exemple 4 : Contrôle de l'activité fusogène de HERV-W Env par sa partie
5 cytoplasmique.

L'implication de la partie cytoplasmique de HERV-W Env dans l'activité fusogène de cette glycoprotéine est démontré par la construction et la caractérisation des glycoprotéines recombinantes suivantes :

W/CD46+, dérivé du CD46 humain, facteur de protection des cellules vis-
10 à-vis du complément et non impliqué dans la formation de syncytia, comportant l'ectodomaine et le domaine transmembranaire de HERV-W Env (aa 1 à 469) fusionnés au domaine cytoplasmique du CD46 (aa 335 à 369). Cette molécule chimère n'est pas fusogénique dans un test de fusion cellule-cellule (Figure 5).

W/R+, dérivé de la glycoprotéine d'enveloppe du rétrovirus MLV-A
15 (amphotropic murine leukemia virus), non fusogénique quand exprimée indépendamment des autres protéines de MLV-A, comportant l'ectodomaine et le domaine transmembranaire de HERV-W Env (aa 1 à 469) fusionnés au domaine cytoplasmique de la glycoprotéine d'enveloppe du rétrovirus MLV-A (aa 622 à 654). Cette molécule chimère n'est pas fusogénique dans un test de fusion cellule-cellule
20 (Figure 5).

RD/W, dérivé de la glycoprotéine d'enveloppe du rétrovirus endogène félin RD114, non fusogénique quand exprimée indépendamment des autres protéines du RD114, comportant le domaine cytoplasmique et le domaine transmembranaire de HERV-W Env (aa 448 à 538) fusionnés à l'ectodomaine de la glycoprotéine
25 d'enveloppe du rétrovirus RD114 (aa 1 à 508). Cette molécule chimère est fusogénique dans un test de fusion cellule-cellule (Figure 5).

La figure 5 annexée représente le schéma et la caractérisation des chimères Env HERV-W précitées et les résultats obtenus dans un test de fusion cellule-cellule.

30 L'ectodomaine de HERV-W Env est défini par le polypeptide dérivé du précurseur protéique contenant les acides-aminés (aa) 21 à 447; le domaine transmembranaire, les aa 448 à 469 et la partie cytoplasmique, les aa 470 à 538 (Blond

et al., (1999) Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *Journal of Virology*. 73:1175-1185).

L'ectodomaine de CD46 est défini par le polypeptide dérivé du précurseur protéique contenant les acides-aminés (aa) 35 à 312; le domaine transmembranaire, les
5 aa 313 à 334 et la partie cytoplasmique, les aa 335 à 369 (Yant et al., (1997), Identification of a cytoplasmic Tyr-X-X-Leu motif essential for down regulation of the human cell receptor CD46 in persistent measles virus infection. *J Virol*. 71:766-770).

L'ectodomaine de MLV-A Env est défini par le polypeptide dérivé du précurseur protéique contenant les acides-aminés (aa) 32 à 598; le domaine
10 transmembranaire, les aa 599 à 621 et la partie cytoplasmique, les aa 622 à 654 (Ott et Rein, (1990), Sequence analysis of amphotropic and 10A1 murine leukemia virus: close relationship to mink cell focus forming viruses. *J Virol*. 64:757-766).

L'ectodomaine de RD114 Env est défini par le polypeptide dérivé du précurseur protéique contenant les acides-aminés (aa) 18 à 508; le domaine
15 transmembranaire, les aa 509 à 530 et la partie cytoplasmique, les aa 531 à 564 (Cosset et al., (1995b), High titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J. Virol*. 69:7430-7436).

SU signifie sous-unité de surface; TM sous-unité transmembranaire; SP peptide signal; tm domaine d'ancrage transmembranaire; cyt partie cytoplasmique;
20 RBD domaine de liaison au récepteur; PRR région riche en proline; C domaine carboxy-terminal de la SU.

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection de l'expression d'une protéine ou d'un polypeptide d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain, caractérisé en ce que la protéine ou le polypeptide présente une séquence polypeptidique qui comprend la séquence SEQ ID NO :1 ou un fragment de SEQ ID NO :1 ou une séquence présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80%, de préférence au moins 90%, ou encore au moins 95% d'identité avec la séquence SEQ ID NO:1 ou avec un fragment de SEQ ID NO :1, et en ce qu'on détecte le pouvoir fusogène de ladite protéine ou dudit fragment dans des cellules d'un tissu cellulaire ou d'une culture cellulaire, par la mise en évidence de la formation de syncytia.

2. Procédé de détection de l'expression d'une protéine ou d'un polypeptide d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain, caractérisé en ce que la protéine ou le polypeptide présente une séquence polypeptidique présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80%, de préférence au moins 90%, ou encore au moins 95% d'identité avec la séquence SEQ ID NO:1, et en ce qu'on détecte le pouvoir fusogène de ladite protéine dans des cellules d'un tissu cellulaire, ou d'une culture cellulaire par la mise en évidence de la formation de syncytia.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la protéine est codée par le gène *env* du rétrovirus endogène HERV-W.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la protéine est codée par un cadre de lecture ouvert situé sur le chromosome 7 du génome humain.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la protéine présente une séquence polypeptidique présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80%, de préférence au moins 90%, ou encore au moins 95% d'identité avec la séquence SEQ ID NO:1.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la protéine présente une séquence polypeptidique qui consiste en SEQ ID NO:1.

7. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polypeptide présente une séquence polypeptidique qui commence à l'acide aminé 448 et se termine à l'acide aminé 538 de SEQ ID NO : 1.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le polypeptide présente une séquence polypeptidique présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80%, de préférence au moins 90%, ou encore au moins 95% d'identité avec la séquence polypeptidique qui commence à l'acide aminé 448 et se termine à l'acide aminé 538 de SEQ ID NO:1.

9. Procédé selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce que le polypeptide présente une séquence polypeptidique qui consiste en la séquence polypeptidique qui commence à l'acide aminé 448 et se termine à l'acide aminé 538 de SEQ ID NO:1.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les cellules dudit tissu ou de ladite culture cellulaire sont choisies parmi les cellules osseuses, les cellules musculaires, les cellules placentaires, les cellules endothéliales, en particulier des vaisseaux sanguins, les cellules épithéliales, les cellules gliales et les cellules tumorales ou issues de lignées cellulaires tumorales.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la détection du pouvoir fusogène de ladite protéine consiste à :

obtenir un vecteur d'expression de ladite protéine à partir duquel l'expression de la protéine ou de son gène est sous la dépendance d'un promoteur, de préférence un promoteur fort,

transfecter des cellules par le vecteur obtenu pour obtenir des cellules productrices, exprimant à leur surface ladite protéine, et

observer la formation de syncytia ou l'absence de formation de syncytia.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que la détection du pouvoir fusogène de la protéine consiste à :

obtenir un vecteur d'expression de ladite protéine à partir duquel l'expression de la protéine ou de son gène est sous la dépendance d'un promoteur, de préférence un promoteur fort,

transfecter des cellules par le vecteur obtenu pour obtenir des cellules productrices, exprimant à leur surface ladite protéine,

co-cultiver des cellules naïves indicatrices exprimant à leur surface un récepteur de ladite protéine en présence desdites cellules productrices, et

observer la formation de syncytia ou l'absence de formation de syncytia.

13. Utilisation d'un gène ou d'un acide nucléique ou d'un fragment de gène ou d'un acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1, 6 ou 9, dans des conditions appropriées
5 permettant son expression, pour préparer une composition thérapeutique ou prophylactique.

14. Utilisation selon la revendication 13, caractérisée en ce que ladite composition est destinée au traitement de cancers.

15. Utilisation selon la revendication 13, caractérisée en, ce que ladite
10 composition est destinée à prévenir une déficience dans l'élaboration du placenta ou à prévenir une déficience dans la formation naturelle de tout autre type de syncytia, ladite déficience étant associée à une pathologie.

16. Utilisation selon la revendication 13, 14 ou 15, caractérisée en ce que la composition est destinée à un traitement par thérapie génique.

15 17. Composition thérapeutique ou prophylactique comprenant un gène ou un acide nucléique ou un fragment de gène ou d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 9.

18. Composition selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'elle
20 comprend en outre un promoteur hétérologue ou autologue, de préférence hétérologue, pour l'expression de ladite protéine ou dudit polypeptide.

19. Vecteur d'expression comprenant au moins un gène ou un acide nucléique ou un fragment de gène ou d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 9, et des
25 éléments nécessaires à son expression dans une cellule hôte.

20. Cellule hôte comprenant au moins un vecteur selon la revendication 19.

21. Composition thérapeutique ou prophylactique comprenant au moins un vecteur d'expression selon la revendication 19.

22. Utilisation d'une composition selon l'une quelconque des
30 revendications 17, 18 et 19, pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement de cancers par destruction des cellules cancéreuses au moyen de la formation de syncytia.

23. Utilisation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 17, 18 et 19, pour l'obtention d'un médicament destiné à prévenir une déficience dans l'élaboration du placenta ou à prévenir une déficience dans la formation naturelle de tout autre type de syncytia, ladite déficience étant associée à une pathologie.

5 24. Utilisation d'une protéine ou d'un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 9 dans un vecteur de thérapie génique, ledit vecteur de thérapie génique comprenant, entre autres, une protéine ou un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 9.

10 25. Vecteur de thérapie génique comprenant une protéine ou un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 9.

26. Vecteur selon la revendication 25, choisi parmi un vecteur rétroviral de type MLV, un vecteur lentiviral pseudotypés par une protéine ou un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 9, un vecteur synthétique.

15 27. Composition thérapeutique comprenant, entre autres, un vecteur de thérapie tel que défini dans l'une des revendications 25 et 26 et une séquence d'acide nucléique ou un oligonucléotide anti-sens.

28. Composition thérapeutique comprenant, entre autres, un vecteur de thérapie tel que défini dans l'une des revendications 25 et 26 et un gène d'intérêt thérapeutique.

20 29. Cellule exprimant une protéine ou un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 9.

30. Utilisation d'une cellule selon la revendication 29, comme vecteur cellulaire.

25 31. Composition thérapeutique comprenant, entre autres, une cellule ou vecteur cellulaire tel que défini dans les revendications 29 et 30.

30 32. Procédé pour la sélection de drogues ou substances médicamenteuses ou de systèmes gène/pro-drogue susceptibles d'intervenir qualitativement et/ou quantitativement sur le pouvoir fusogène d'une protéine ou d'un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 9, selon lequel on met en contact ladite drogue ou substance médicamenteuse ou ledit système gène/pro-drogue avec des

cellules d'une culture cellulaire exprimant ladite protéine ou ledit polypeptide et, on observe une régression ou une disparition dans la formation de syncytia.

33. Composition thérapeutique comprenant, entre autres, une séquence d'acide nucléique ou un oligonucléotide anti-sens susceptible de s'hybrider à un gène ou
5 un fragment de gène ou à un acide nucléique ou fragment d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 9.

34. Composition thérapeutique comprenant, entre autres, un ligand susceptible de reconnaître et de se lier au récepteur de la protéine définie en SEQ ID
10 NO : 1.

35. Composition thérapeutique selon la revendication 34 comprenant au moins un ligand choisi parmi un anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un anticorps transmembranaire ou un fragment desdits anticorps, une molécule inhibitrice, ledit ligand étant spécifique du récepteur de la protéine définie en SEQ ID NO : 1.

15 36. Composition thérapeutique comprenant, entre autres, un gène d'intérêt thérapeutique, ledit gène codant pour un ligand tel que défini dans la revendication 35 et étant placé sous le contrôle des éléments nécessaires pour assurer son expression *in vivo*.

20 37. Vecteur de thérapie génique comprenant à sa surface le récepteur de la protéine identifiée en SEQ ID NO : 1, notamment pour cibler des cellules produisant la protéine identifiée en SEQ ID NO : 1 de façon constitutive ou induite.

FIG. 2 suite

Consensus	CTCAGCCAAT	GGATGCCCTG	GATTCGCC	TTCTTAGGAC	CTCTAGCAGC	TATATATTTG	CTACTCTCT	TTGGACCCCTG	TATCTTTTAAC	CTCTTGTTA	ACTTGTCTC	TTCCAGAATC	1440
Env ADN 6	1440
Env ADN 10	1440
Env ADN 21	1440
Consensus	GAAGCTGTAA	AACACAAAT	GGAGGCCAAG	ATGCAATGCA	AGACTTAAGAT	CTACCGCAGA	CCCTGGACC	GGCCTGCTAG	CCGAGATCT	GATGTTAATG	ACATCAAAGG	CACCCCTCCT	1560
Env ADN 6	1560
Env ADN 10	1560
Env ADN 21	1560
Consensus	GAGGAATCT	CAGCTGCACA	ACCTCTACTA	CGCCCCAATT	CAGCAGGAAG	CAGTTAG							1617
Env ADN 6							1617
Env ADN 10							1617
Env ADN 21							1617

FIG. 4

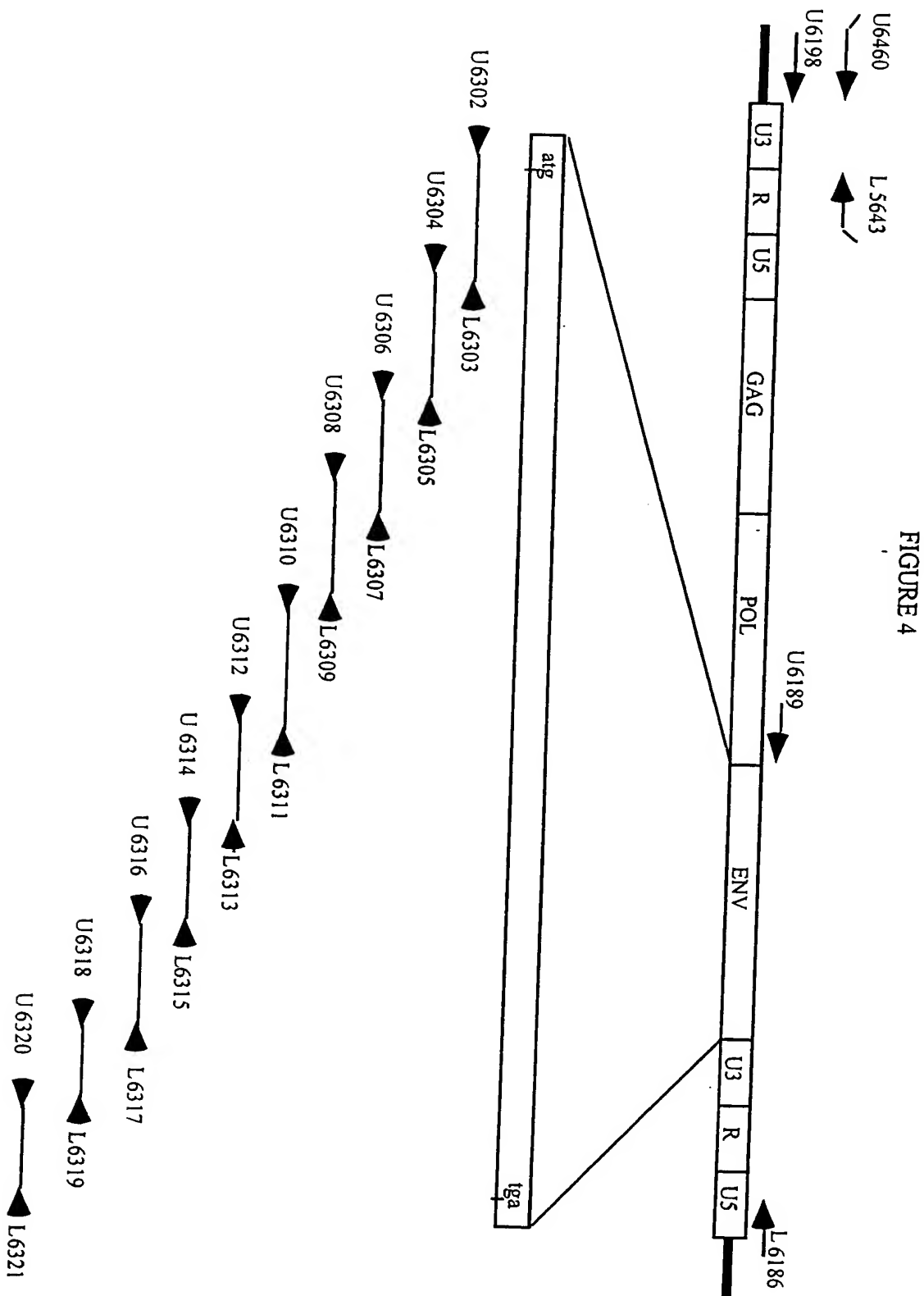


FIG. 5

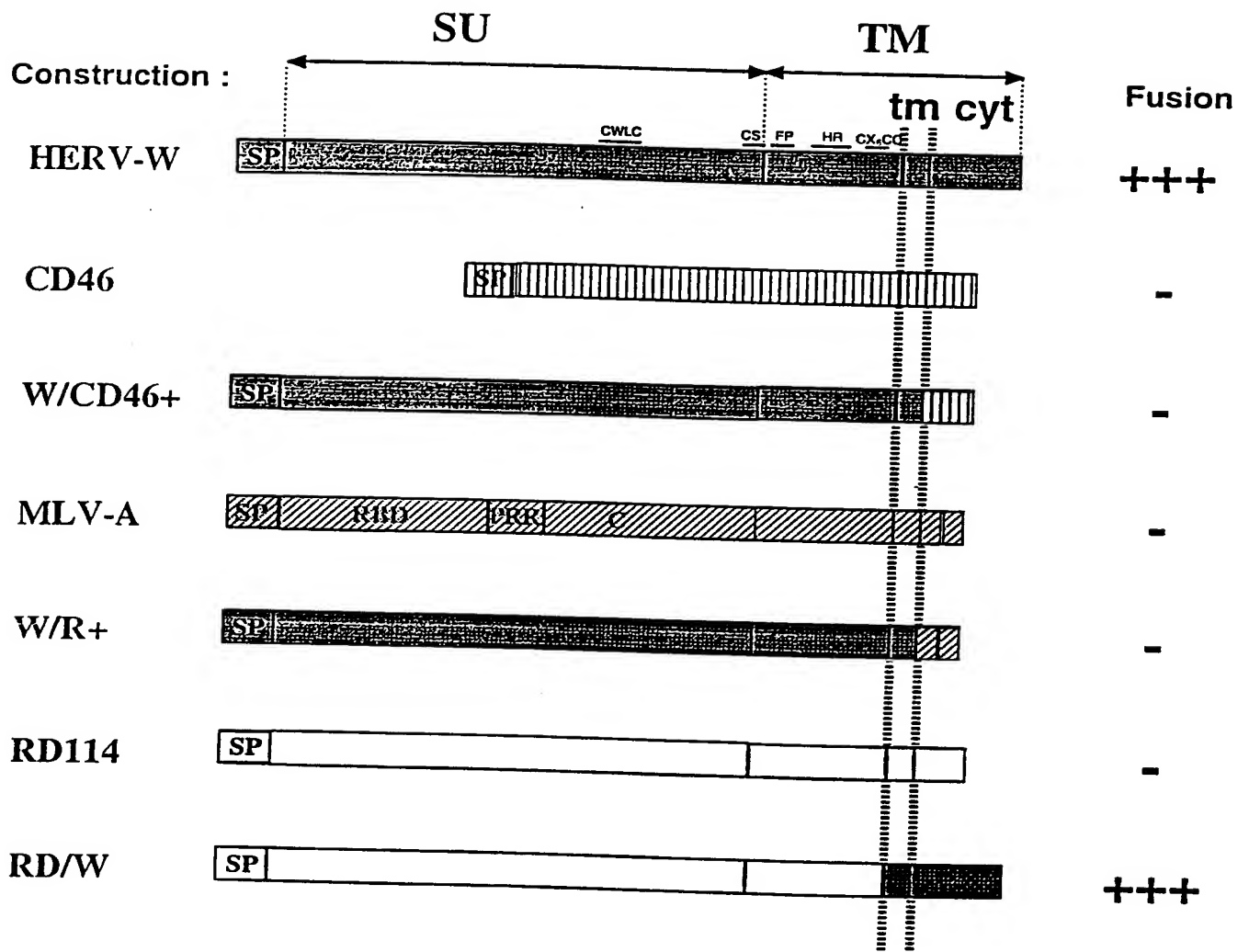


Figure XXX. Schéma et caractérisation des Env HERV-W chimères.

LISTE DE SEQUENCES

<110> BIO MERIEUX

5 <120> Procédé de détection de l'expression d'une protéine
d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain et
utilisations d'un gène codant pour cette protéine

<130> Pouvoir fusogène de env de ERV-W

10

<140>

<141>

<160> 2

15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 538

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Leu Pro Tyr His Ile Phe Leu Phe Thr Val Leu Leu Pro Ser

25

1

5

10

15

Phe Thr Leu Thr Ala Pro Pro Pro Cys Arg Cys Met Thr Ser Ser Ser

20

25

30

30 Pro Tyr Gln Glu Phe Leu Trp Arg Met Gln Arg Pro Gly Asn Ile Asp

35

40

45

Ala Pro Ser Tyr Arg Ser Leu Ser Lys Gly Thr Pro Thr Phe Thr Ala

50

55

60

35

His Thr His Met Pro Arg Asn Cys Tyr His Ser Ala Thr Leu Cys Met

65

70

75

80

His Ala Asn Thr His Tyr Trp Thr Gly Lys Met Ile Asn Pro Ser Cys

40

85

90

95

Pro Gly Gly Leu Gly Val Thr Val Cys Trp Thr Tyr Phe Thr Gln Thr
 100 105 110

5 Gly Met Ser Asp Gly Gly Gly Val Gln Asp Gln Ala Arg Glu Lys His
 115 120 125

Val Lys Glu Val Ile Ser Gln Leu Thr Arg Val His Gly Thr Ser Ser
 130 135 140

10 Pro Tyr Lys Gly Leu Asp Leu Ser Lys Leu His Glu Thr Leu Arg Thr
 145 150 155 160

His Thr Arg Leu Val Ser Leu Phe Asn Thr Thr Leu Thr Gly Leu His
 15 165 170 175

Glu Val Ser Ala Gln Asn Pro Thr Asn Cys Trp Ile Cys Leu Pro Leu
 180 185 190

20 Asn Phe Arg Pro Tyr Val Ser Ile Pro Val Pro Glu Gln Trp Asn Asn
 195 200 205

Phe Ser Thr Glu Ile Asn Thr Thr Ser Val Leu Val Gly Pro Leu Val
 210 215 220

25 Ser Asn Leu Glu Ile Thr His Thr Ser Asn Leu Thr Cys Val Lys Phe
 225 230 235 240

Ser Asn Thr Thr Tyr Thr Thr Asn Ser Gln Cys Ile Arg Trp Val Thr
 30 245 250 255

Pro Pro Thr Gln Ile Val Cys Leu Pro Ser Gly Ile Phe Phe Val Cys
 260 265 270

35 Gly Thr Ser Ala Tyr Arg Cys Leu Asn Gly Ser Ser Glu Ser Met Cys
 275 280 285

Phe Leu Ser Phe Leu Val Pro Pro Met Thr Ile Tyr Thr Glu Gln Asp
 290 295 300

40

Leu Tyr Ser Tyr Val Ile Ser Lys Pro Arg Asn Lys Arg Val Pro Ile
 305 310 315 320

5 Leu Pro Phe Val Ile Gly Ala Gly Val Leu Gly Ala Leu Gly Thr Gly
 325 330 335

Ile Gly Gly Ile Thr Thr Ser Thr Gln Phe Tyr Tyr Lys Leu Ser Gln
 340 345 350

10 Glu Leu Asn Gly Asp Met Glu Arg Val Ala Asp Ser Leu Val Thr Leu
 355 360 365

Gln Asp Gln Leu Asn Ser Leu Ala Ala Val Val Leu Gln Asn Arg Arg
 370 375 380

15 Ala Leu Asp Leu Leu Thr Ala Glu Arg Gly Gly Thr Cys Leu Phe Leu
 385 390 395 400

Gly Glu Glu Cys Cys Tyr Tyr Val Asn Gln Ser Gly Ile Val Thr Glu
 20 405 410 415

Lys Val Lys Glu Ile Arg Asp Arg Ile Gln Arg Arg Ala Glu Glu Leu
 420 425 430

25 Arg Asn Thr Gly Pro Trp Gly Leu Leu Ser Gln Trp Met Pro Trp Ile
 435 440 445

Leu Pro Phe Leu Gly Pro Leu Ala Ala Ile Ile Leu Leu Leu Leu Phe
 450 455 460

30 Gly Pro Cys Ile Phe Asn Leu Leu Val Asn Phe Val Ser Ser Arg Ile
 465 470 475 480

Glu Ala Val Lys Leu Gln Met Glu Pro Lys Met Gln Ser Lys Thr Lys
 35 485 490 495

Ile Tyr Arg Arg Pro Leu Asp Arg Pro Ala Ser Pro Arg Ser Asp Val
 500 505 510

40 Asn Asp Ile Lys Gly Thr Pro Pro Glu Glu Ile Ser Ala Ala Gln Pro

515

520

525

Leu Leu Arg Pro Asn Ser Ala Gly Ser Ser

530

535

5

<210> 2

<211> 2781

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

15 atgggagctg ttttcatgct atttcactct attaaatctt gcaactgcac tcttctgggc 60
 catgtttctt acggctcgag ctgagctttt gtcaccgctc caccactgct gtttgccacc 120
 accgcagacc tgccgctgac tcccatccct ctggatcctg cagggtgtcc gctgtgctcc 180
 tgatccagcg aggcgccccat tgccgctccc aattgggcta aaggcttgcc attgttcctg 240
 cacggctaag tgccctgggtt tgttctaatt gagctgaaca ctagtcactg ggttccatgg 300
 ttctcttctg tgacccacgg cttctaatag aactataaca cttaccacat ggcccaagat 360
 20 tccattcctt ggaatccgtg aggccaagaa ctccagggtca gagaatacga ggcttgccac 420
 catcttgga ggggctgct accatcttgg aagtgggtca ccaccatctt gggagctctg 480
 tgagcaagga cccccggta acatcttggc aaccacgaac ggacatccaa agtgatacat 540
 cctgggaagg accctacca gtcattttat ctacccaac tgcggttaaa gtggctggag 600
 tggagtcttg gatacatcac acttgagtca aatcctggat actgccaaag gaacctgaaa 660
 25 atccaggaga caacgctagc tattcctgtg aacctctaga ggatttgccg ctgctcttca 720
 aacaacaacc aggaggaaa taactaaaat cataaatccc catggccctc cttatcata 780
 ttttctctt tactgttctt ttaccctctt tcaactctac tgcacccctc ccatgccgct 840
 gtatgaccag tagctccctt taccaagagt ttctatggag aatgcagcgt cccggaaata 900
 ttgatgccc atcgatatag agtctttcta aggaacccc caccttcaact gccacaccc 960
 30 atatgcccc caactgctat cactctgcca ctctttgcat gcatgcaaact actcattatt 1020
 ggacaggaaa aatgattaat cctagttgtc ctggaggact tggagtcact gtctgttgga 1080
 cttacttcac ccaaactggg atgtctgatg ggggtggagt tcaagatcag gcaagagaaa 1140
 aacatgtaaa agaagtaatc tcccaactca cccgggtaca tggcacctct agcccctaca 1200
 aaggactaga tctctcaaaa ctacatgaaa ccctccgtac ccatactcgc ctggtaagcc 1260
 35 tatttaatac caccctcaact gggctccatg aggtctcggc ccaaaaccct actaactgtt 1320
 ggatatgcct cccctgaac ttcaggccat atgtttcaat ccctgtacct gaacaatgga 1380
 acaacttcag cacagaaata aacaccactt ccgttttagt aggacctctt gtttccaatc 1440
 tggaaataac ccatacctca aacctcacct gtgtaaaatt tagcaatact acatacacia 1500
 ccaactccca atgcatcagg tgggtaactc ctccacaca aatagtctgc ctaccctcag 1560
 40 gaatatTTTT tgtctgtggg acctcagcct atcgttgttt gaatggctct tcagaatcta 1620

	tgtgcttctt	ctcattctta	gtgcccccta	tgaccatcta	cactgaacaa	gatttataca	1680
	gttatgtcat	atctaagccc	cgcaacaaaa	gagtacccat	tcttcctttt	gttataggag	1740
	cgggagtgt	aggtgcacta	ggtactggca	ttggcggtat	cacaacctct	actcagttct	1800
	actacaaact	atctcaagaa	ctaaatgggg	acatggaacg	ggtcgccgac	tccctgggtca	1860
5	ccttgcaaga	tcagcttaac	tccctagcag	cagtagtcct	tcaaaatcga	agagcttttag	1920
	acttgctaac	cgctgaaaga	gggggaacct	gtttattttt	aggggaagaa	tgctgttatt	1980
	atgttaatca	atccggaatc	gtcactgaga	aagttaaaga	aattcgagat	cgaatacaac	2040
	gtagagcaga	ggagcttcga	aacactggac	cctggggcct	cctcagccaa	tgatgccct	2100
	ggattctccc	cttcttagga	cctctagcag	ctataatatt	gctactcctc	tttggaacct	2160
10	gtatctttta	cctccttggt	aactttgtct	cttccagaat	cgaagctgta	aaactacaaa	2220
	tggagcccaa	gatgcagtc	aagactaaga	tctaccgcag	accctggac	cggcctgcta	2280
	gccacgata	tgatgttaat	gacatcaaag	gcacccctcc	tgaggaaatc	tcagctgcac	2340
	aacctctact	acgccccaat	tcagcaggaa	gcagttagag	cggtcgtcgg	ccaacctccc	2400
	caacagcact	taggttttcc	tggtgagatg	ggggactgag	agacaggact	agctggattt	2460
15	cctaggctga	ctaagaatcc	ctaagcctag	ctgggaaggt	gaccacatcc	acctttaaac	2520
	acggggcctt	caacttagct	cacacctgac	caatcagaga	gctcactaaa	atgctaatta	2580
	ggcaaagaca	ggaggtaaag	aaatagccaa	tcatctattg	cctgagagca	cagcaggagg	2640
	gacaatgatc	gggatataaa	cccaagtctt	cgagccggca	acggcaaccc	cctttgggtc	2700
	ccctcccttt	gtatgggagc	tctgttttca	tgctatttca	ctctattaaa	tcttgcaact	2760
20	gcaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	a				2781

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/FR 00/02429

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/15 C12N15/48 A61P35/00 A61P15/00 A61K39/21
A61K48/00 C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, STRAND, EMBL, GENSEQ, MEDLINE, SCISEARCH, CHEM ABS Data, BIOTECHNOLOGY ABS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 02696 A (BIO MERIEUX ; BESEME FREDERIC (FR); BLOND JEAN LUC (FR); BOUTON OLI) 21 January 1999 (1999-01-21)	13, 15-21, 23-31, 33,34
Y	page 8, line 35 -page 9, line 4 claims 12,20 page 3, line 17-19	1-6, 10-12, 22,23,32
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 December 2000

Date of mailing of the international search report

29/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

ALCONADA RODRIG., A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/FR 00/02429

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>BLOND JEAN-LUC ET AL: "Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 73, no. 2, February 1999 (1999-02), pages 1175-1185, XP000946152 ISSN: 0022-538X page 1184, left-hand column page 1180, right-hand column, paragraph 2; figure 7</p>	<p>13, 15-21, 23-31, 33,34</p>
X	<p>WO 99 26972 A (GENETICS INST) 3 June 1999 (1999-06-03)</p> <p>page 29, line 21 -page 30, line 26 page 49, line 14-29 page 52, line 10-29 page 69, line 10-18 page 76, line 6-10</p>	<p>13,14, 16-21, 24-31, 33,34</p>
X	<p>TAILOR CHETANKUMAR S ET AL: "A sodium-dependent neutral-amino-acid transporter mediates infections of feline and baboon endogenous retroviruses and simian type D retroviruses." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 73, no. 5, May 1999 (1999-05), pages 4470-4474, XP002148313 ISSN: 0022-538X page 4472, left-hand column, last paragraph -right-hand column, paragraph 1; table 1</p>	<p>37</p>
X	<p>RASKO JOHN E J ET AL: "The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 96, no. 5, 2 March 1999 (1999-03-02), pages 2129-2134, XP002148314 March 2, 1999 ISSN: 0027-8424 the whole document</p>	<p>37</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/02429

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WANG BIN ET AL: "Molecular cloning, expression, and biological characterization of an HTLV-II envelope glycoprotein: HIV-1 expression is permissive for HTLV-II-induced cell fusion." AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, vol. 9, no. 9, 1993, pages 849-860, XP000925933 ISSN: 0889-2229 page 853, left-hand column, paragraph 1 -page 854, left-hand column, last paragraph; tables 1-3 ---</p>	<p>1-6, 10-12, 22,23,32</p>
Y	<p>LIN L ET AL: "Expression of endogenous retrovirus ERV-3 induces differentiation in BeWo, a choriocarcinoma model of human placental trophoblast." PLACENTA, vol. 20, no. 1, January 1999 (1999-01), pages 109-118, XP000925932 ISSN: 0143-4004 page 113, right-hand column, paragraph 3 -page 114, left-hand column, paragraph 1; figures 5,6 ---</p>	<p>1-6, 10-12, 22,23,32</p>
Y	<p>DORANZ B J ET AL: "A SMALL-MOLECULE INHIBITOR DIRECTED AGAINST THE CHEMOKINE RECEPTOR CXCR4 PREVENTS ITS USE AS AN HIV-1 CORECEPTOR" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, JP, TOKYO, vol. 186, no. 8, 20 October 1997 (1997-10-20), pages 1395-1400, XP000669413 ISSN: 0022-1007 page 1397, right-hand column, paragraph 2; figure 3 ---</p>	<p>32</p>
P,X	<p>AVISSAR N E ET AL: "Characterization of antibodies to intestinal Na⁺ dependent neural amino acid transporter (B0)." GASTROENTEROLOGY, vol. 118, no. 4 Suppl. 2 Part 1, April 2000 (2000-04), page A69 XP000946467 101st Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and the Digestive Disease Week.; San Diego, California, USA; May 21-24, 2000 ISSN: 0016-5085 abstract --- -/--</p>	<p>34-36</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/FR 00/02429

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>VOISSET CECILE ET AL: "Chromosomal distribution and coding capacity of the human endogenous retrovirus HERV-W family."</p> <p>AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, vol. 16, no. 8, 20 May 2000 (2000-05-20), pages 731-740, XP000925926</p> <p>ISSN: 0889-2229</p> <p>page 736, right-hand column, paragraph 3</p> <p>-page 737, left-hand column, paragraph 2; figures 1,4</p> <p>page 738, right-hand column, paragraph 2</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>1-6, 10-13, 15-34</p>
P,X	<p>MI SHA ET AL: "Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis."</p> <p>NATURE (LONDON), vol. 403, no. 6771, 17 February 2000 (2000-02-17), pages 785-789, XP002147935</p> <p>ISSN: 0028-0836</p> <p>the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>1-6, 10-34</p>
P,X	<p>BLOND JEAN-LUC ET AL: "An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor."</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 74, no. 7, April 2000 (2000-04), pages 3321-3329, XP000946327</p> <p>ISSN: 0022-538X</p> <p>the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>1-6, 10-34</p>
P,X	<p>WO 99 60020 A (GENETICS INST)</p> <p>25 November 1999 (1999-11-25)</p> <p>page 25, line 7 - line 22</p> <p>page 28, line 29 -page 29, line 25</p> <p>example 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-6, 10-13, 15-34</p>

Continuation of Box I.2

Claim 33 of the present application concerns a very wide variety of compounds. However, a support basis as defined by PCT Article 6 and/or a disclosure as defined by PCT Article 5 can only be found for a small part of compounds. Consequently, the search was limited to those parts of the claims which are supported and disclosed, that is those parts concerning a polypeptide of SEQ ID NO:1 or fragments of said polypeptide.

Claims 34-37 of the present application concern a very wide variety of compounds. However a support basis as defined by PCT Article 6 and/or a disclosure as defined by PCT Article 5 can only be found for a small part of compounds. Consequently, the search was limited to those parts of the claims which are supported and disclosed, that is those parts concerning the polypeptide RDR1/ATBo, which is the receptor of the type D retrovirus and also a transporter of neutral amino acids (ATBo) (see example 3).

Claim 34 of the present application concerns a very wide variety of compounds. However, a support basis as defined by PCT Article 6 and/or a disclosure as defined by PCT Article 5 can only be found for a small part of compounds. Consequently, the search was limited to those parts of the claims which are supported and disclosed, that is those parts concerning a polypeptide of SEQ ID NO:1, monoclonal, polyclonal or transmembrane antibodies directed against the polypeptide of SEQ ID NO:1 (The polypeptide RDR1/ATBo)

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, concerning inventions in respect of which no search report has been established need not be the subject of a preliminary examination report (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the line of conduct adopted by the EPO acting in its capacity as International Preliminary Examining Authority is not to proceed with a preliminary examination on a subject in respect of which no search has been carried out. This attitude will remain unchanged, notwithstanding whether the claims have been modified or not, either after the search report has been received, or during any procedure under Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Patent Application No

PCT/FR 00/02429

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9902696 A	21-01-1999	AU 8447098 A EP 1000158 A	08-02-1999 17-05-2000
WO 9926972 A	03-06-1999	AU 1417899 A EP 1032593 A AU 4189999 A WO 9960020 A	15-06-1999 06-09-2000 06-12-1999 25-11-1999
WO 9960020 A	25-11-1999	AU 1417899 A AU 4189999 A EP 1032593 A WO 9926972 A	15-06-1999 06-12-1999 06-09-2000 03-06-1999

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE :

Dema. internationale No

PCT/FR 00/02429

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07K14/15 C12N15/48 A61P35/00 A61P15/00 A61K39/21
A61K48/00 C12N5/10

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C07K A61K A61P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, STRAND, EMBL, GENSEQ, MEDLINE, SCISEARCH, CHEM ABS Data, BIOTECHNOLOGY ABS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 99 02696 A (BIO MERIEUX ; BESEME FREDERIC (FR); BLOND JEAN LUC (FR); BOUTON OLI) 21 janvier 1999 (1999-01-21)	13, 15-21, 23-31, 33,34
Y	page 8, ligne 35 -page 9, ligne 4 revendications 12,20 page 3, ligne 17-19	1-6, 10-12, 22,23,32

	-/--	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 décembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

29/12/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

ALCONADA RODRIG., A

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	BLOND JEAN-LUC ET AL: "Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 73, no. 2, février 1999 (1999-02), pages 1175-1185, XP000946152 ISSN: 0022-538X page 1184, colonne de gauche page 1180, colonne de droite, alinéa 2; figure 7 ---	13, 15-21, 23-31, 33,34
X	WO 99 26972 A (GENETICS INST) 3 juin 1999 (1999-06-03) page 29, ligne 21 -page 30, ligne 26 page 49, ligne 14-29 page 52, ligne 10-29 page 69, ligne 10-18 page 76, ligne 6-10 ---	13,14, 16-21, 24-31, 33,34
X	TAILOR CHETANKUMAR S ET AL: "A sodium-dependent neutral-amino-acid transporter mediates infections of feline and baboon endogenous retroviruses and simian type D retroviruses." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 73, no. 5, mai 1999 (1999-05), pages 4470-4474, XP002148313 ISSN: 0022-538X page 4472, colonne de gauche, dernier alinéa -colonne de droite, alinéa 1; tableau 1 ----	37
X	RASKO JOHN E J ET AL: "The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 96, no. 5, 2 mars 1999 (1999-03-02), pages 2129-2134, XP002148314 March 2, 1999 ISSN: 0027-8424 le document en entier ----- -/--	37

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>WANG BIN ET AL: "Molecular cloning, expression, and biological characterization of an HTLV-II envelope glycoprotein: HIV-1 expression is permissive for HTLV-II-induced cell fusion."</p> <p>AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, vol. 9, no. 9, 1993, pages 849-860, XP000925933</p> <p>ISSN: 0889-2229</p> <p>page 853, colonne de gauche, alinéa 1</p> <p>-page 854, colonne de gauche, dernier alinéa; tableaux 1-3</p>	1-6, 10-12, 22,23,32
Y	<p>LIN L ET AL: "Expression of endogenous retrovirus ERV-3 induces differentiation in BeWo, a choriocarcinoma model of human placental trophoblast."</p> <p>PLACENTA, vol. 20, no. 1, janvier 1999 (1999-01), pages 109-118, XP000925932</p> <p>ISSN: 0143-4004</p> <p>page 113, colonne de droite, alinéa 3</p> <p>-page 114, colonne de gauche, alinéa 1; figures 5,6</p>	1-6, 10-12, 22,23,32
Y	<p>DORANZ B J ET AL: "A SMALL-MOLECULE INHIBITOR DIRECTED AGAINST THE CHEMOKINE RECEPTOR CXCR4 PREVENTS ITS USE AS AN HIV-1 CORECEPTOR"</p> <p>JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, JP, TOKYO, vol. 186, no. 8, 20 octobre 1997 (1997-10-20), pages 1395-1400, XP000669413</p> <p>ISSN: 0022-1007</p> <p>page 1397, colonne de droite, alinéa 2; figure 3</p>	32
P,X	<p>AVISSAR N E ET AL: "Characterization of antibodies to intestinal Na+ dependent neural amino acid transporter (B0)."</p> <p>GASTROENTEROLOGY, vol. 118, no. 4 Suppl. 2 Part 1, avril 2000 (2000-04), page A69 XP000946467</p> <p>101st Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and the Digestive Disease Week.; San Diego, California, USA; May 21-24, 2000</p> <p>ISSN: 0016-5085</p> <p>abrégé</p>	34-36

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	<p>VOISSET CECILE ET AL: "Chromosomal distribution and coding capacity of the human endogenous retrovirus HERV-W family."</p> <p>AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, vol. 16, no. 8, 20 mai 2000 (2000-05-20), pages 731-740, XP000925926 ISSN: 0889-2229</p> <p>page 736, colonne de droite, alinéa 3 -page 737, colonne de gauche, alinéa 2; figures 1,4 page 738, colonne de droite, alinéa 2</p> <p>---</p>	1-6, 10-13, 15-34
P,X	<p>MI SHA ET AL: "Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis."</p> <p>NATURE (LONDON), vol. 403, no. 6771, 17 février 2000 (2000-02-17), pages 785-789, XP002147935 ISSN: 0028-0836</p> <p>le document en entier</p> <p>---</p>	1-6, 10-34
P,X	<p>BLOND JEAN-LUC ET AL: "An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor."</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 74, no. 7, avril 2000 (2000-04), pages 3321-3329, XP000946327 ISSN: 0022-538X</p> <p>le document en entier</p> <p>---</p>	1-6, 10-34
P,X	<p>WO 99 60020 A (GENETICS INST) 25 novembre 1999 (1999-11-25)</p> <p>page 25, ligne 7 - ligne 22 page 28, ligne 29 -page 29, ligne 25 exemple 1</p> <p>-----</p>	1-6, 10-13, 15-34

SUIITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

La revendication 33 présente a trait une très grande variété de composés. Un fondement au sens de L'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT ne peut cependant être trouvé que pour une petite partie des composés. Par conséquent, la recherche a été limitée aux parties des revendications qui présentent un fondement et un exposé, c'est-à-dire les parties ayant trait au polypeptide de SEQ ID NO:1 ou aux fragments dudit polypeptide.

Les revendications 34-37 présentes ont trait une très grande variété de composés. Un fondement au sens de L'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT ne peut cependant être trouvé que pour une petite partie des composés. Par conséquent, la recherche a été limitée aux parties des revendications qui présentent un fondement et un exposé, c'est-à-dire les parties ayant trait au polypeptide RDR1/ATBo, qui est le récepteur de retrovirus du type D et aussi un transportateur de acides aminés neutres (ATBo) (voir exemple 3).

La revendication 34 présente ont trait une très grande variété de composés. Un fondement au sens de L'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT ne peut cependant être trouvé que pour une petite partie des composés. Par conséquent, la recherche a été limitée aux parties des revendications qui présentent un fondement et un exposé, c'est-à-dire les parties ayant trait au polypeptide de SEQ ID NO:1, aux anticorps monoclonaux, polyclonaux ou transmembranaires dirigés contre le récepteur du polypeptide de SEQ ID NO:1 (le polypeptide RDR1/ATBo)

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 00/02429

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9902696 A	21-01-1999	AU 8447098 A EP 1000158 A	08-02-1999 17-05-2000
WO 9926972 A	03-06-1999	AU 1417899 A EP 1032593 A AU 4189999 A WO 9960020 A	15-06-1999 06-09-2000 06-12-1999 25-11-1999
WO 9960020 A	25-11-1999	AU 1417899 A AU 4189999 A EP 1032593 A WO 9926972 A	15-06-1999 06-12-1999 06-09-2000 03-06-1999